



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103649333 B

(45)授权公告日 2017.02.15

(21)申请号 201280030566.8

(22)申请日 2012.04.20

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103649333 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据  
61/477,357 2011.04.20 US  
61/477,437 2011.04.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.12.20

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/034596 2012.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/145730 EN 2012.10.26

(73)专利权人 梅撒生物科技公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 马克·德容 罗伯特·B·凯瑞  
内森·J·科布

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021  
代理人 纪晓峰

(51)Int.Cl.  
C12Q 1/68(2006.01)  
C12M 1/38(2006.01)

(56)对比文件  
CN 101400993 A,2009.04.01,  
US 2010248273 A1,2010.09.30,  
杨朝国等.核酸检测技术新进展.《四川省卫  
生管理干部学院学报》.2002,(第01期),  
审查员 王瑶

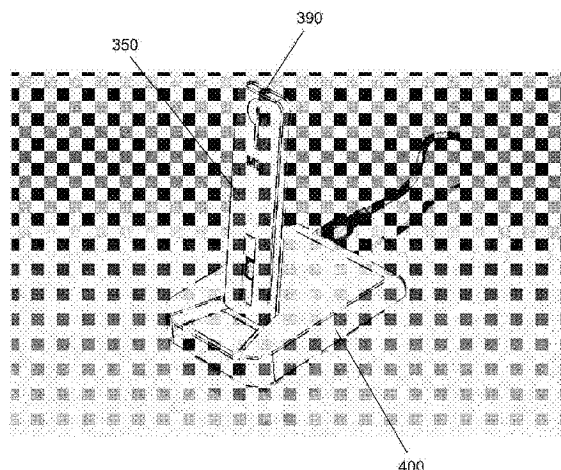
权利要求书2页 说明书25页  
序列表1页 附图17页

## (54)发明名称

用于核酸检测和鉴定的集成装置

## (57)摘要

一种包括多个室的用于检测靶核酸的一次性测定平台,和一种操作所述测定平台的方法。通过打开排气袋将包含所述靶核酸的溶液从一个室转移到下一个室。产生的压力变化允许溶液流到下一个室。该平台包括电子层和一个或多个粘合在一起的流体层。所有的加热操作均可以通过使用平台中的电阻加热元件进行。所有的冷却操作优选是被动的。所述平台优选在处于垂直定向时操作,并且可以入坞到控制所述平台的操作的外部坞站上。



1. 用于检测靶核酸的一次性平台,所述一次性平台包括:  
样品室,其用于接收包含所述靶核酸的样品;  
扩增室,其通过第一通道与所述样品室连接并且通过第二通道与第一排气袋连接;  
标记室,其通过第三通道与所述扩增室连接并且通过第四通道与第二排气袋连接;  
检测子系统,其通过第五通道与所述标记室连接并且通过第六通道与第三排气袋连接;  
多个电阻加热元件;和  
一个或多个温度测量装置;  
其中所述排气袋各自通过位于所述电阻加热元件中的一个附近的热不稳定性材料密封而与较低的压力隔绝。
2. 权利要求1的一次性平台,其还包括样品制备台,所述样品制备台包括与所述样品室的输入直接流体连接的输出。
3. 权利要求1的一次性平台,其中所述扩增室的平的表面的尺寸与同所述扩增室热接触的电阻加热元件的平的表面的尺寸相同。
4. 权利要求1的一次性平台,其中所述扩增室不通过主动冷却装置进行冷却。
5. 权利要求1的一次性平台,其中所述扩增室包含扩增溶液,所述样品室包含液体扩增试剂混合物或冻干的扩增试剂混合物,和/或所述标记室包含检测粒子。
6. 权利要求1的一次性平台,其中所述标记室能够用所述电阻加热元件中的一个加热。
7. 权利要求1的一次性平台,其中所述检测子系统包括侧流条,所述侧流条不包括检测粒子。
8. 权利要求1的一次性平台,其中所述样品室、扩增室和标记室、所述第一通道、第二通道、第三通道、第四通道、第五通道和第六通道和所述第一排气袋、第二排气袋和第三排气袋位于流体组件层上,并且所述电阻加热元件位于包括印刷电路板的单独的层上,所述单独的层粘合在所述流体组件层上。
9. 权利要求1的一次性平台,其中所述检测子系统位于流体组件层上。
10. 权利要求8的一次性平台,其中所述检测子系统位于第二流体组件层上。
11. 权利要求1的一次性平台,其中所述样品室、扩增室和标记室中的至少一个的体积在1微升和50微升之间。
12. 权利要求1的一次性平台,其还包括用于使所述一次性平台入坞的连接器的连接,所述连接器具有基座部件,所述基座部件不是外部设备并且所述基座部件保持所述一次性平台处于垂直或倾斜的定向。
13. 一种用于检测靶核酸的方法,其中所述方法用于非诊断目的,所述方法由下述步骤组成:  
将包含所述靶核酸的样品放置在权利要求1的一次性平台的所述样品室中;  
使所述一次性平台垂直或倾斜定向;  
使所述样品与液体的或先前冻干的扩增试剂混合物反应;  
将与扩增室连接的第一排气袋向大气开放,由此允许已反应的样品流到所述扩增室中;  
在所述扩增室中扩增所述靶核酸;

将与标记室连接的第二排气袋向大气开放,由此允许扩增的靶核酸流到所述标记室中;

在所述标记室中用检测粒子标记所述扩增的靶核酸;

将与检测子系统连接的第三排气袋向较低的压力开放,由此允许所标记的靶核酸流到所述检测子系统中;并且

检测所述扩增的靶核酸。

14. 权利要求13的方法,其中扩增步骤包括使用位于所述一次性平台内的在所述扩增室邻近的电阻加热元件来扩增所述靶核酸。

15. 权利要求13的方法,其还包括被动冷却所述扩增室。

16. 权利要求13的方法,其还包括在标记步骤过程中用位于所述一次性平台内的在所述标记室邻近的电阻加热元件加热所述标记室。

17. 权利要求13的方法,其中所述检测子系统不包括检测粒子。

18. 权利要求13的方法,其还包括通过用不是外部设备的坞站来控制所述一次性平台的操作。

## 用于核酸检测和鉴定的集成装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2011年4月20日提交的题目为“用于核酸检测和鉴定的集成装置(Integrated Device for Nucleic Acid Detection and Identification)”的美国临时专利申请系列号61/477,357和于2011年4月20日提交的题目为“用于核酸的振荡扩增反应(Oscillating Amplification Reaction for Nucleic Acids)”的美国临时专利申请系列号61/477,437的优先权和利益,所述申请通过引用结合在本文中。

[0003] 序列列表、表格或计算机程序的引用

[0004] 申请人在此提交命名为042012\_ST25.txt的文本文件的序列列表,该文件于2012年4月20日生成,有2K千字节,是符合ASCII编码的,并且通过引用结合于此。

[0005] 发明背景

[0006] 发明领域(技术领域):

[0007] 本发明的实施方案涉及一种用于检测和鉴定核酸的集成装置和相关的方法。所述装置可以是完全一次性的,或可以包括一次性部分和可重复使用的部分。

### 背景技术:

[0008] 注意:下述讨论涉及多份出版物和参考文献。本文中对所述出版物的讨论给出更完整的科学原理背景,并且不应该被解释为承认所述出版物是用于确定专利性目的的现有技术。

[0009] 由于对传染病和新出现疾病、生物威胁试剂、遗传病和致病因子的环境储库的公共健康影响和认识已经增加了,因此,对于更加信息化、灵敏和特异性的使用点快速测定的需求已使得对基于聚合酶链式反应(PCR)的工具的要求增加。通过诸如基于PCR的扩增的方法进行的基于核酸的分子检测是非常灵敏的、特异性的和信息化的。不幸的是,目前可用的核酸检测不适合现场使用或现场使用的实用性有限,原因在于其需要精巧的且昂贵的仪器、专业的实验室材料和/或依赖于使用者干预的多个操作。因此,大部分用于分子检测的样品被装运到集中式实验室,这导致获得所需要的信息的长的周转时间。

[0010] 为了解决对于快速的使用点分子检测的需求,之前的尝试集中在利用一次性盒和相对昂贵的相关设备的产品设计。使用外部设备来完成流体移动、扩增温度控制和检测简化了集成分子检测所需要的多个过程所固有的多个工程挑战。不幸的是,对精巧的设备的依赖性给小诊所、地方和州政府以及执法机构增加了巨大的经济障碍。此外,在需求增加的期间过程中,对少量运行检测的设备的依赖性可能引起不必要的延误,如在怀疑的生物战争剂释放或新出现的流行病的过程中发生的不必要的延误。实际上,当爆发需要过负荷能力和增加的通量时,设备和一次性试剂盒模型成为潜在显著的瓶颈。另外,对设备的依赖性使得特别是测试装置到部署场所的配送复杂化,在所述部署场所处后勤约束妨碍大体积相关设备的运送或者不满足基础设施要求(例如,可靠的电源)。

[0011] 已经描述重力作为现有的微流体装置中的流体运动方式。然而,典型的装置不允许对所述流体运动或多于两种流体的混合的可编程控制或电子控制。此外,一些装置当垂



直定向时利用通过下落迟缓的或预先包装的流体产生的压力下降诱导轻微的真空,并且将反应物汲取到处理室中,为确保预先包装的流体的稳定性,这增加了存储和运输的复杂性。教导在多个分立步骤中移动流体的现有的装置需要各个室之间的易碎的密封或阀门,这使得操作和制作变得复杂。这些装置没有教导利用用于每个室的独立的、位于远处的排气口。

[0012] 典型的微流体装置典型地利用比在标准实验室步骤中所用的更少的反应体积。在检测和研究实验室中,PCR或其他核酸扩增反应,如环介导的扩增(LAMP),基于核酸的序列扩增(NASBA)和其他等温和热循环方法典型地使用5-100微升的反应体积进行。这些反应体积适合检测足以保证检测稀释试样中的稀少的测定靶标的试样体积。相对于传统实验室分子检测所用的那些体积减少反应体积的微流体系统还必需减少可以添加到反应中的试样体积。较少的反应体积的结果是容纳充足的试样体积以确保稀释的试样中存在可检测到的量的靶标或测定靶标稀少时的能力下降。

#### [0013] 发明概述

[0014] 本发明的一个实施方案是用于检测靶核酸的一次性平台,所述一次性平台包括:样品室,其用于接收包含所述靶核酸的样品;扩增室,其通过第一通道与所述样品室连接并且通过第二通道与第一排气袋连接;标记室,其通过第三通道与所述扩增室连接并且通过第四通道与第二排气袋连接;检测子系统,其通过第五通道与所述标记室连接并且通过第六通道与第三排气袋连接;多个电阻加热元件;和一个或多个温度测量装置;其中所述排气袋各自通过位于所述电阻加热元件中的一个附近的热不稳定性膜密封与大气隔绝。所述一次性平台任选地进一步包括样品制备台,其包括与样品室的输入直接流体连接的输出。所述扩增室的基本上平的表面的尺寸优选与同所述扩增室热接触的电阻加热元件的基本上平的表面的尺寸大致相同。扩增室优选不通过主动冷却装置进行冷却。所述扩增室任选地包含扩增溶液,所述样品室任选地包含液体扩增试剂混合物或冻干的扩增试剂混合物,和/或所述标记室任选地包含检测粒子。所述标记室优选地可用电阻加热元件中的一个加热。所述检测子系统包括侧流条,其优选地不包括检测粒子。所述各个室、各个通道和各个排气袋优选地位于流体组件层上,并且各个电子元件优选地位于包括印刷电路板的单独的层上,所述单独的层粘合在所述流体组件层上。所述检测子系统优选地位于流体组件层上或任选地位于第二流体组件层上。至少一个室的体积优选地在约1微升和约50微升之间。所述一次性平台优选地进一步包括用于使所述一次性平台入坞的连接器的,所述连接器具有基座部件,所述基座部件不是外部设备并且保持所述一次性平台处于垂直或倾斜的定向。

[0015] 本发明的一个实施方案是一种用于检测靶核酸的方法,所述方法由下述步骤组成:将包含所述靶核酸的样品放置在一次性平台的样品室中;使所述一次性平台垂直或倾斜定向;使所述样品与液体的或先前冻干的扩增试剂混合物反应;将与扩增室连接的第一排气袋向大气开放,由此允许已反应的样品流到所述扩增室中;在所述扩增室中扩增所述靶核酸;将与标记室连接的第二排气袋向大气开放,由此允许扩增的靶核酸流到所述标记室中;在所述标记室中用检测粒子标记所述扩增的靶核酸;将与检测子系统连接的第三排气袋向大气开放,由此允许所标记的靶核酸流到所述检测子系统中;并且检测所扩增的靶核酸。扩增步骤优选地包括使用位于所述一次性平台内的在所述扩增室邻近的电阻加热元件来扩增靶核酸。所述方法优选地还包括被动冷却扩增室。所述方法优选地还包括在标记步骤过程中用位于所述一次性平台内的在所述标记室邻近的电阻加热元件加热所述标记

室。所述检测子系统优选地不包括检测粒子。所述方法优选地进一步包括通过用不是外部设备的坞站来控制所述一次性平台的操作。

[0016] 本发明的目的、优点和新特征以及进一步的适用性范围将部分在下述详述中结合附图描述,并且在考查下述后本领域技术人员将明白其中的部分,或者可以通过本发明的实施而学习。本发明的目的和优点可以通过在附上的权利要求中特别指出的手段和组合来实现和获得。

#### [0017] 附图简述

[0018] 结合在说明书中并且形成说明书的一部分的附图举例说明本发明的各个实施方案,并且,与说明书一起来解释本发明的原理。所述附图仅用于举例说明本发明的某些实施方案的目的,并且不应该解释为限制本发明。在所述附图中:

[0019] 图1是示例本发明的一个实施方案的流体和电子层的图。制备的样品流体进入样品室,在其中其与优选冻干的试剂混合。在垂直定向上,流体柱的压力与其下密封的空气体积平衡。毛细作用防止空气溢出和进一步的流体推进。当在相对应的排气袋下的适当的排气口密封破裂时,流体通过出口通道移动到下一个室中进行进一步的处理。优选地使用标准的印刷电路组件(PCA)组件和组装技术实现温度和流体控制。

[0020] 图2A是在本发明的一个实施方案中所用的排气机构的示意图,所述排气机构完成在流体层内的受控的流体移动。图2B是示例本发明的一个实施方案中的排气口位置和构造的图。膜保持流体柱的压力高于环境压力。当施加足够的热时,膜破裂并且允许压力平衡。流体沿着流体静压力梯度移动。压力可以低于几个mBar。

[0021] 图3显示本发明的一个实施方案的电阻加热器的更多详情。在印刷电路板(PCB)上两个2512尺寸的厚膜表面贴装器件(SMD)电阻器(加热元件)侧接0402尺寸的电热调节器(温度传感器)。在所述电阻器和所述扩增室的界面处的导热化合物的薄层保持对加热器和传感器的导热性。优选选择该室的尺寸以使面积/体积比率最大。

[0022] 图4显示本发明的实施方案,其支持基于热循环或等温的核酸扩增方法。图4A显示具有四个电阻器/电热调节器对的PCA。四个表面贴装电阻器作用为四个独立的可控加热器(箭头)。图(B显示与图4A的PCA连接的流体组件,其与图3的电阻加热器的详情相一致。流体层与PCA的表面贴装电阻器接口,以提供用于核酸扩增的反应室。图4C显示扩增反应的凝胶电泳,由PCR机器(LAB)或通过本发明的实施方案( $\mu$ 加热器)通过热循环产生~150bp(碱基对)的产物。最左面的泳道是尺寸标准品。图4D是在本实施方案的扩增室内的流体的温度相对于时间(单位为秒)的图表。深色线表示通过热电耦获得的反应室中的溶液的温度。浅色线是通过用于温度控制的微控制器所用的电热调节器测量的温度。使用20 $\mu$ L的反应体积,可以在少于20分钟内完成40个循环的双温度PCR反应。图4E显示基于等温核酸序列的扩增(NASBA)反应的凝胶电泳,由PCR机器(阳性对照)或通过使用本发明的一个实施方案产生~150bp的产物。四个独立的反应表示温度传感器的设置和向流体室内部施加的特殊的表面处理。

[0023] 图5示例本发明的一个实施方案,该实施方案包括不利用排气口转运流体的技术。通过加热在流体柱下方的室,气体将膨胀并且通过入口通道自我清除。当冷却时,室体积内的气体将收缩并且吸入与所清除的气体成比例的流体体积。流体滴落到室底。连续重复这一循环可以移动全部反应体积。该技术的操作取决于通道尺寸、长度、加热时间和温度、室

体积和部件的表面能。

[0024] 图6显示本发明的一个实施方案的标记室的详情和功能。包含扩增子的流体通过入口通道进入标记室,并且与检测粒子接触。通过加热或煮沸流体而实现充分的混合。优选通过纹理特征如激光蚀刻的线条或系列线条而使在室底部和侧面核化(nucleated)的上升气泡优选有效地搅拌混合物。在该实施方案中,SMD部件与扩增加热器中所用的部件相同。

[0025] 图7显示本发明的一个实施方案的流体层的元件。所选厚度的壁部件通过面部件粘合在两个侧面上。在一个实施方案中,壁部件是0.5mm的激光切割的丙烯酸塑料,面是0.004"聚酯(PET)薄膜。所述部分优选地用硅氧烷转移粘合剂粘合在一起。处理内部表面以控制润湿。在制造过程中加入试剂和侧流组件。粘合剂膜优选密封在排气袋上。

[0026] 图8显示本发明的一个实施方案的朝向流体组件的PCA侧面,其中加热元件是厚膜电阻器。温度传感器是紧邻加热器放置的小的SMD电热调节器。PCA可以任选地结合用于监测测定进展、加热和排气孔开放的指示器LEDs。

[0027] 图9是示例按照本发明的一个实施方案用粘合垫片粘合到PCA上的流体盒的图。所述垫片的厚度对于排气口和加热器的正确距离和功能可以是重要的。

[0028] 图10A显示本发明的半一次性发明构造实施方案的一次性的PCA。该PCA仅包含与一次性流体组件接口的电子元件。这包括加热元件、温度传感器和任选地LED指示器。存在连接器以完成电路并且任选地在垂直定向上增加支撑。

[0029] 图10B显示位于坞站中的图10A的一次性的PCA/流体组件。所述坞站包含控制电子器件和电源,并且任选地易于便携和手持。包含PCA的一次性部分和流体组件插接在连接器中,优选地以垂直定向插接。在一些实施方案中,可以任选地存在包括指示LEDs、LCD和用户控制的界面。坞站可以包括启动测定所需要的电子过程的按钮。

[0030] 图11A是本发明的一次性发明构造实施方案的PCA的正面的图。该侧朝向流体组件。在该实施方案中存在加热元件和传感器元件以及用户界面部件,如LED指示器。

[0031] 图11B是示例图11A的一次性发明构造的PCA的背面的布局的图。PCB的该侧容纳控制电路,如微控制器,MOSFET转换器,和辅助电路。在该实施方案中,存在用于9V电池的端子,以及可选的用户界面装置如可用于启动测定的触摸开关。

[0032] 图11C是安装了9V电池的图11B的PCA的图。没有显示塑料壳体。电池放置优选地如所示一样,以降低质量中心并且帮助防止在操作过程中装置的倾翻(tipping)或翻倒。

[0033] 图12是本发明的半一次性实施方案的示例,其中样品制备子系统与扩增和检测流体和电子器件接口。

[0034] 图13显示结合在一次性测定中的多层流体层的实施方案的各部件。

[0035] 图14显示结合图13的流体层的一次性测定检测盒的分解图。

[0036] 图15是放置在坞站中的图14的组装的一次性PCA/流体组件的示例。

[0037] 图16是本发明的一个实施方案的流体层的照片,其支持基于热循环的核酸扩增和检测。将包含支持核酸扩增所需要的所有试剂的反应液添加到样品室中。在图16A中,将需要的酶以液体形式添加到反应液中。在图16B中,需要的酶通过在样品室中包含冻干的小丸而提供。核酸的扩增和检测如实施例1所述进行。检测条组件的顶部线条代表阳性对照,即,与检测探针互补的寡核苷酸。紧接在该阳性对照下方的线条表示捕获线,即,与同检测探针相同的扩增产物链互补的固定化的寡核苷酸。

[0038] 图17A和17B是通过使样品制备子系统与本发明接口而制造的集成的样品-到-结果的核酸检测装置的照片。本发明的各个实施方案支持在单一集成装置中进行核酸分离、扩增和检测。核酸分离、扩增和检测如实施例2所述进行。侧流组件的顶部线条代表阳性对照,即,与检测探针互补的寡核苷酸。紧接在该阳性对照下方的线条表示捕获线,即,与同检测探针相同的扩增产物链互补的固定化的寡核苷酸。显示该装置,然后完成对来自患有柑桔黄龙病(citrus greening disease)的柑桔属树的浸渍的叶片组织的处理,并且对通过集成的样品制备系统分离的核酸测定韧皮部杆菌(*Candidatus Liberibacter*),其为柑桔黄龙病的致病因子。

#### [0039] 发明详述

[0040] 本发明的各个实施方案包括一种一次性平台,该平台集成进行核酸分子测定的所有必需步骤的仪器独立操作的方式,并且用新一代的核酸检测来补充当前的免疫侧流快速测定,提供了更加信息化和灵敏的分析。本发明的各个实施方案促进快速核酸检测在小诊所中以及在简陋设施下的更广泛的应用,在那里传染病、生物威胁剂、农业和环境检测最可能具有最大的影响。本发明的某些实施方案完全是独立的并且是一次性的,这通过允许运行平行测试而没有仪器操作产生的瓶颈而能够在需求增加时“过负荷能力(surge capacity)”。另外,在这些应用地区,在这里耦合便宜的电池供电的或AC适配器通电的坞站的低成本一次性检测盒是优选的,使用简单的坞站的本发明的一个实施方案通过将可重复使用的部件放置在可重复使用的且便宜的基座上而进一步降低检测的成本。本文公开的平台技术提供与实验室基于核酸扩增的方法相似的灵敏度,最少的使用者干预和培训需求,扩增和检测均赋予的序列特异性,多路能力,稳定的试剂,与低成本大规模制作的碱溶性,电池操作允许在简陋设施中使用,并且灵活的平台技术允许结合另外的或备选的生物标志物而无需重新设计装置。

[0041] 本发明的各个实施方案提供用于低成本、使用点核酸检测和鉴定的系统和方法,其适合在远离通常进行检测的实验室环境的场所进行分析。有利地,核酸扩增反应体积可以在与常规实验室检测常用的相同的体积范围内(例如,5-100 $\mu$ L)。因此,在本发明的各个实施方案中所进行的反应直接比得上公认的实验室测定,并且允许容纳与常规分子检测典型所用的相同的试样体积。

[0042] 本发明的各个实施方案可以用来检测一种或多种靶核酸序列在样品中的存在。靶序列可以是DNA,如染色体DNA或染色体外DNA(例如,线粒体DNA,叶绿体DNA,质粒DNA等),或RNA(例如,rRNA,mRNA,小RNAs和病毒RNA)。类似地,本发明的各个实施方案可以用来鉴定核酸多态性,包括单核苷酸多态性、缺失、插入、倒置和序列重复。此外,本发明的各个实施方案可以用来检测基因调节事件,如在转录水平的基因上调和下调。因此,本发明的各个实施方案可以用于这样的应用,如:1)检测并鉴定在农业、临床、食品、环境和兽医样品中的病原体核酸;2)检测疾病的遗传生物标志物;和3)响应于病原体、毒素、其他致病因子、环境刺激或代谢状态的的存在通过检测疾病或代谢状态的相关生物标志物来诊断疾病或代谢状态,所述疾病或代谢状态的相关生物标志物诸如基因调节事件(mRNA的上调或下调,或诱导小RNAs,或在疾病或代谢状态过程中产生的或抑制的其他核酸分子)。

[0043] 本发明的各个实施方案包括在加入核酸样品时进行靶核酸样品制备、扩增和检测的方式,其包括流体控制、温度控制和试剂混合的所有方面。

[0044] 在本发明的一些实施方案中,所述装置提供使用诸如电池的便携式电源进行核酸检测的方式,并且是完全一次性的。在本发明的其他实施方案中,一次性核酸测试检测盒与简单的可重复使用的电子元件联合工作,所述电子元件不执行典型的实验室仪器的所有功能。

[0045] 本发明的各个实施方案提供一种核酸扩增和检测装置,其包括,但不限于,壳体,电路板和流体或微流体层。在某些实施方案中,所述电路板可以包含多个表面贴装元件,如电阻器、电热调节器、发光二极管(LEDs)、光电二极管和微控制器。所述流体或微流体层负责移动水性反应体积,并且可以由多种塑料和通过多种制造技术(包括粘合、激光切割器的熔融或层压、水喷射切割或注塑件)制成。流体和电路板元件保持在一起并且它们的热耦合可以通过导热材料或化合物而被增强。所述壳体优选部分作为装饰和保护套,隐藏所述微流体和电路板层的精密元件,并且还可以起作用促进样品输入、缓冲剂释放、核酸洗脱和装置功能性所需要的过程启动。例如,壳体可以结合样品输入端口、按钮或类似的机械部件以允许使用者激活、缓冲剂释放、样品流动起始和/或核酸洗脱。

[0046] 在本发明的一些实施方案中,所述流体或微流体层优选地包括四个室:包括样品输入室、扩增室、核酸标记室和检测室。所述溶液输入室优选地包括样品输入孔,其中可以加入包含核酸的样品,和通向扩增室的排出导管。所述样品输入室还可以包括冻干的试剂,其可以包括适当的缓冲剂、盐、脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、寡核苷酸引物和酶,如DNA聚合物和反转录酶。所述冻干的试剂优选地在加入核酸样品时溶解。所述扩增室优选地与电路板上的加热器元件对准(register)并热接触放置。相似地,在电路板上存在的电子器件元件与流体层中的排气口或阀门结构物理接触或邻近放置,以允许电子控制。设计电路板的物理布局,以提供与流体或微流体层的部件的对准(registration),从而使用于扩增和/或流体流动控制的电路板电阻加热元件放置成形成与它们相互作用的流体部件的元件的接触。

[0047] 本发明的其他实施方案包括一种与样品制备装置集成的核酸扩增和检测装置。包括所述样品制备装置的实施方案提供用于在样品制备子系统输出端口或阀门与装置的流体或微流体部件的一个或多个输入端口之间的流体流通的方式。

[0048] 除非另外定义,本文所用的所有技术术语、符号和其他科学术语意欲具有本发明所属领域的技术人员通常所理解的意思。本文所述或引用的技术和方法通常为本领域技术人员充分理解和使用常规的方法常规应用,诸如,例如,在Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册),第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社),Cold Spring Harbor,N.Y.和Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学方法)(Ausbel等编,John Wiley& Sons,Inc.2001中所述的广泛应用的分子克隆方法。适当地,包括应用商购试剂盒和试剂的方法通常按照供应商定义的流程和/或参数进行(除非另外指明)。

[0049] 当在整个说明书和权利要求书中使用时,术语‘靶核酸’或‘模板核酸’意指要被检测的单链的或双链的DNA或RNA片段或序列。

[0050] 当在整个说明书和权利要求书中使用时,术语‘微粒’或‘检测粒子’意指用于标记在扩增反应过程中产生的核酸产物的任意化合物,包括对双链体核酸特异性的荧光染料,荧光修饰的寡核苷酸,和寡核苷酸-缀合的量子点或固相部件如聚苯乙烯、胶乳或顺磁粒子

或微球体。

[0051] 当在整个说明书和权利要求书中使用时,术语‘室’意指流体区室,流体在导入另一个室之前在该流体区室中停留一段时间。例如,室可以为样品室、扩增室、标记室或检测室。

[0052] 当在整个说明书和权利要求书中使用时,术语‘袋’意指覆盖在电阻器或充当排气机构的其他机构上的区室。例如,与上述流体室不同,在流体层中产生的袋可以具有与PCA上的电阻器相配的一个开口面。该开口面优选地被薄膜覆盖,从而产生一个密封的腔,该薄膜通过对下方的电阻器供电而容易破裂。

[0053] 当在整个说明书和权利要求书中使用时,术语‘通道’意指在流体组件内的窄的导管,其典型的连接两个以上的室和/或袋或其组合,包括,例如,入口、出口或排气通道。在入口或出口通道的情形中,流体样品通过通道迁移。在排气通道的情形中,导管保持不接触流体并且连接流体室与排气袋。

[0054] 当在整个说明书和权利要求书中使用时,术语‘外部设备’意指可重复使用的设备,其加热和/或冷却一次性测定,和/或对一次性测定进行机械作用,包括但不限于,刺穿缓冲液包装和/或泵入流体或另外主动提供流体转运力。

[0055] 本发明的各个实施方案是适于在远离通常进行检测的实验室环境的场所进行分析的低成本的使用点核酸检测的装置。某些装置包括流体和电子器件元件或层,任选地由保护性壳体包装。在本发明的实施方案中,流体层是由塑料组成的,并且是通过窄通道连接的一系列的室和袋,其中在操作过程中,室相对于彼此垂直定向。流体层被电子器件元件覆盖或另外与电子器件元件物理接触放置,电子器件元件如包含现成的表面贴装器件(SMDs)(off-the-shelf surface mount devices)并通过微控制器控制的印刷电路板。在所述装置的一些实施方案中,整个组件是一次性的。在其他实施方案中,流体和物理粘合的电子器件层是一次性的,而小的便宜的控制部是可重复使用的。在另一个实施方案中,流体层是一次性的,小的控制基座部件是可重复使用的。对于所有的实施方案,本发明可以与如在国际公布号W02009/137059A1中所述的核酸样品制备装置集成,所述国际公布的题目为“高度简化的基于侧向流的核酸样品制备和被动流体流动控制(Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control)”(通过引用结合在本文中),和/或使用其中所述的方法。

[0056] 本发明的各个实施方案包括一种集成的核酸检测装置,其可以用已经建立的制作工艺便宜地制备。本发明提供分子检测数据,同时从广泛公认的手持免疫测定的终端用户角度保持简易性,克服了在装置内调节流体温度的挑战,在连续的步骤中运送小的样品体积,试剂混合,并且检测核酸。本发明的各个实施方案独特地适合使用可以通过标准组装技术构建的现成的电子元件,并且不需要移动部件。此外,流体层的设计允许使用容易获得的塑料和制作技术。结果是能够进行核酸分离、扩增和检测的便宜的、一次性的和可靠的装置,而不需要精密的实验室设施。

[0057] 现有的核酸检测装置通常使用复杂的加热元件,如沉积膜加热器和Peltier装置,其增加了显著的成本和/或需要专门的制造方法。在本发明的实施方案中,反应液的加热优选使用简单的电阻表面贴装器件实现,该电阻表面贴装器件可以用几美分或更少的钱买到,并且通过常规的制造标准组装和测试。通过使流体室分层放置在这些电阻元件和相连

的传感器元件上,可以便利地调节反应液的流体温度。SMD电阻器在电子工业中的广泛使用确保本发明符合充分建立的质量控制方法。多种核酸扩增技术,诸如PCR,不仅需要反应液快速加热,还需要快速冷却。本发明中的反应室优选地在一侧加热,并且利用通过对面的环境温度来帮助降低流体温度。另外,与如果所述装置水平定向相比,所述装置实施方案的垂直定向允许通过被动的对流更快速的冷却,因此,无需使用昂贵的风扇或Peltier装置就能减少热循环周期。

[0058] 流体控制是与低成本核酸检测装置设计相关的另一个挑战。本领域已知的装置通常使用机电的、动电的或压电的泵机构,以在装置运转过程中操作流体。这些泵元件增加装置的复杂性和成本。类似地,利用精细的微机械设计的阀门或移动部件由于复杂性(如移动部件故障或生物污损)可能增加制作成本并且降低可靠性。与之前所述的核酸检测装置不同,本发明的实施方案使用在微控制器控制下的流体静压力以及毛细管作用力和表面张力来操作流体体积。本发明的一些实施方案的垂直定向允许反应液在微控制器的控制下从室到室的流注,从而适应测定所需要的操作。流体可以通过通道尺寸与表面张力的平衡而保持在单独的反应室中,其中表面张力通过气驱而阻止流体前进。优选地,样品仅在微控制器控制下激活简单的排气机构后前进到下部室中。一旦打开,借助于提供被驱离的空气随流体进入而从第二室溢出的路径,排气口允许流体从第一室移动到第二室中。流体层内的每个室优选地通过狭窄的排气通道与密封的排气袋连接。排气袋优选地在一面用薄塑料膜密封,所述薄塑料膜通过加热在该膜下的小的表面贴装电阻器而容易破裂。一旦下部室的排气口打开,则流体继续前进,甚至在低的流体静压下。

[0059] 如下文更具体所述,在本发明的一些实施方案中所用的流体或微流体阀门机构优选地利用与热不稳定的密封热接触和(任选的)物理接触的加热元件,以允许通过使较低高度的室排气来允许流体从较高高度的室流到较低的室中的方式电子控制流体的移动。在一个实施方案中,使用广泛应用的和充分建立的电子器件制造方法将表面贴装电阻器贴在印刷电路板上,并且与由热不稳定材料组成的通道密封物理接触放置。当通电时表面贴装电阻器产生充足的热量足以使密封破裂,这导致室排气至较低的压力,诸如环境压力,由此允许流体从较高高度的室流动到较低高度的室中。优选不使用在较高高度的室与较低高度的室之间的直接密封。通道和密封可以位于远离流体室的位置,由此促使流体装置布局采用对制造有效的构造。密封材料可以包括能够密封排气通道并且如所述通过加热破裂的任意材料,例如,薄塑料片。设备中的这种流体移动控制的方法得益于材料成本低,适于使用已建立的层压和电子器件制造技术制造,同时提供在电子控制电路(如微处理器或微控制器)的控制下使流体通过一系列的室移动的能力。使用排气口、热不稳定的材料密封所述排气口(并且不密封流体室或流体微通道本身)以及用热破坏所述密封的电子方式提供了一种控制流体通过装置流动的方式,从而允许在预先确定的时间或在特定事件(例如,达到某种温度、温度变化或一系列的温度变化、或完成一个或多个温育时间或其他事件)完成后的流体移动。

[0060] 另外,与密封流体室本身相比,所述排气方法具有许多优点。排气袋可以位于流体布局上的任意位置,并且通过排气通道与它们所调节的室简单地连通。从制造观点看来,排气袋可以这样放置,以使对于所有的排气袋(其可以包括排气袋歧管(manifold))只有单个密封膜固定在流体层上,优选地通过充分建立的方法如粘合剂、热层压、超声焊接、激光焊

接等固定。相反,直接密封流体室需要将密封材料放置在与每个室位置相对应的不同位置,这更难于进行制造。与通过单个膜密封的单个排气袋歧管相比,这代表制造过程中更具挑战性的环节。

[0061] 另外,位于室处的密封材料可能与该室中容纳的溶液接触。这需要使用这样的材料:(i)其不干扰在所述室中进行的反应,并且(ii)其不被所述溶液影响。考虑到生化反应对化学抑制剂和检测之前的扩增和标记所用的升高的温度的敏感性,可接受的材料的列表是有限的。此外,除了防止溶液在熔融密封材料时被加热之外,与用于在升高的温度下进行反应的反应室直接相连的热敏性材料的物理接近代表确保阀门密封材料与反应过程中所用的升高的温度热隔离的显著挑战。为了避免阀门失灵,热敏性材料必须远离热源放置,或者热敏性材料必须在充分高于反应中所用的最高温度的温度下活化。在小型装置中与室直接相连的远处放置的密封产生对流体布局的限制,这妨碍使用紧凑的物理设计。并且使用较高的温度触发位于反应室位点处的阀门可能对在略微高于所用的反应温度时失去稳定性的生化成分有害。最后,如果直接将室密封,则熔融的密封材料可能保留在各室之间的通道中,堵塞流动。密封材料的粘度在流体柱中可能需要比在小型重力驱动的设备中更大的压力。

[0062] 在本发明的实施方案中,试剂混合不需要比其他系统更多的复杂性。核酸扩增所需要的试剂,如缓冲剂、盐、脱氧核糖核苷酸、寡核苷酸引物和酶优选地使用冻干的小丸或块状物而稳定地结合。这些密封在流体室中的冻干的试剂可以在与水性溶液接触时容易地溶解。在需要另外的混合的情形中,本发明的实施方案的垂直定向提供新型的混合溶液方法的机会。通过使用在流体室之下的加热器,当溶液包含热敏性成分时,可以将气体加热,将气泡递送到上部室中的反应液中。备选地,在溶液不包含热敏性成分的情形中,加热器可以用于直接将溶液加热到发生沸腾的点。在之前公开的流体和微流体装置中,气泡的发生通常是不合乎需要的,原因在于它们可能积聚在流体室和通道中并且驱离反应液或妨碍流体在装置内的移动。本文所述的本发明的实施方案的垂直设计允许气泡上升至流体表面,仅导致最少的和短暂的流体驱离,有效地减轻了气泡对流体或微流体系统的任何不利的影响。通过煮沸混合对于这种垂直设计也是便利的,因为在关闭加热元件后,在该过程中被驱离的流体仅通过重力作用便返回到初始的流体室中。

[0063] 在本发明的实施方案中,使用比色检测条来检测扩增的核酸。侧流测定(lateral flow)由于其使用容易、可靠和成本低而常用在免疫测定检测中。现有技术包含使用侧流条进行核酸检测的描述,其使用多孔材料作为样品接收带,样品接收带位于标记带处或在标记带附近,所述标记带也由多孔材料组成并且放置在侧流测定装置的一个端部处或附近。在这些现有的发明中,标记结构部分在标记带中。使用多孔材料组成样品接收带和标记带使得一些样品溶液以及检测粒子保持在所述多孔材料中。尽管包含具有可逆固定化的检测需要的结构部分的多孔材料的标记带可以用在本发明的实施方案中,但是,本发明的实施方案优选地使用保持在与侧流条的样品接收带截然不同的并且包含具有低流体保持特征的非多孔材料的装置区域中的检测粒子或结构部分。该方法允许包含核酸靶标的样品在引入到装置的侧流部件的样品接收端的多孔部件之前被标记,并且由此消除样品材料和标记粒子在多孔标记带中的保持和/或损失。该方法进一步允许在检测结构部分的存在下使用不同的样品处理,诸如用高温处理,以完成双链靶标或在单链靶标内的二级结构的变性,而



无需考虑温度对多孔样品接收带或标记带材料或侧流检测条材料的影响。另外,不与样品接收带侧流接触而是进行对流体部件(如排气口或阀门)的控制的标记带的使用允许靶标和标记保持接触持续以由流体流动控制系统所控制的一段时间。因此,本发明的实施方案可以不同于常规的侧流检测条,其中样品和检测粒子相互作用时间和条件是由材料的毛细管转运性质确定的。通过在温度调节的室中结合检测粒子,可能发生双链体核酸的变性,允许有效的基于杂交的检测。在备选实施方案中,利用LEDs、光电二极管和滤光器的组合使用荧光来检测核酸扩增。这些光学检测系统可以用于在扩增过程中和在扩增后的终点检测过程中进行实时核酸检测和定量。

[0064] 本发明的实施方案包括提供一种低成本的使用点系统,其中核酸样品可以被选择性地扩增和检测。进一步的实施方案包括结合核酸样品制备装置,如题目为“高度简化的基于侧流的核酸样品制备和被动流体流动控制(Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control)”的国际公布号W02009/137059A1中所述的核酸样品制备装置。所述装置的实施方案优选地包括塑料流体部件和印刷电路组件(PCA),并且任选地装在保护有源元件的壳体中。温度调节、流体和试剂混合优选地通过微控制器调整。反应盒优选地垂直定向和运行,以使流体静压力、毛细管力和表面张力与微控制器触发的排气相结合,控制流体在装置内的移动。

[0065] 参考图1的示意图,将核酸样品加入到样品室10中。核酸样品可以来源于联机的(即,集成的核酸制备子系统)、独立的核酸制备过程(诸如多种商购方法中的一种,例如,吸附柱(spin column)),然后通过移液管将纯化的核酸加入到装置中,或者来源于包含未处理的核酸的样品。优选地,试剂混合物已经存在于样品室中,或者备选地以后添加,所述试剂混合物可以采用液体形式或干燥形式,包含扩增反应所需要的所有成分,诸如缓冲剂、盐、dNTPs、rNTPs、寡核苷酸引物和/或酶。在一些实施方案中,试剂混合物冻干形成冻干的试剂20。将样品引入到样品室中使得试剂与样品混合,以使所述试剂对所述样品起作用。可以任选地进行任选的气泡混合步骤以进一步混合样品与试剂或者重悬所述试剂。然后,当装置处于垂直定向时,流体优选地通过入口通道40导向位于样品室下方的一个或多个扩增室30中。出口通道45连接扩增室30与后面的室。为了促进多路检测,其中产生多个扩增子,可以通过在扩增室内沉积多个引物组而完成多路扩增。另外地,其中装置结合多个扩增室和检测室的电路板和流体设计支持多个平行的扩增反应,所述反应可以是单路的或多路的反应。该方法减少或消除了本领域技术人员已知的由在同一反应中使用多对引物的多路扩增导致的复杂性。此外,使用多个扩增反应室允许在不同温度方案下同时扩增,从而适应最优化扩增的要求,诸如不同的靶标和/或引物序列所要求的不同的解链温度或退火温度。

[0066] 流体从装置的第一室到第二室的移动优选地通过打开与第二室连接的排气口而实现,如图1-2所示。所述排气口的一个实施方案包括两个部件:排气袋50和排气通道60,所述排气袋的一面包括膜,如聚烯烃,并且与贴装在印刷电路板组件(PCA)75上的电阻器接触,所述排气通道连接排气袋50与处于其控制下的微流体区室。当将流体最先加入到系统的样品室中时,与下游室连接的排气口被密封,并且流体不将通过连接这两个室的通道。微控制器负责将电流传送到位于包括排气袋50的一个面的膜处或附近的加热元件,诸如电阻器70。通过对电阻器通电产生的热使得薄膜80破裂,由此打开排气口。一旦打开,所述排气口通过提供随流体进入被驱离的空气从第二室溢出的方式而允许流体从第一室落入第二

室中。所述排气袋的其他实施方案可以包括除热敏膜之外的密封,并且可以利用其他破坏密封的方法,诸如刺穿、撕开或溶解。

[0067] 扩增室优选地与加热器元件接触,从而提供支持核酸扩增所必需的温度调节方式。在本发明的一些实施方案中,所述扩增室可以在内表面的至少一部分上包含寡核苷酸。如在图1-3中所示,所述装置的实施方案包括从样品室10导向扩增室30的入口通道30,优选地从扩增室30导向标记室90的出口通道45,和导向排气袋50的排气通道60,如上文所述。在扩增室壁95与加热器元件100之间的界面处,放置导热材料如导热油脂或化合物可能是有利的。微控制器调节到优选电阻加热元件的电流,优选地通过金属氧化物半导体场效应晶体管(MOSFETs)的方式,基于由温度传感器110收集的数据,优选地使用简单的打开/关闭或比例积分微分(proportional integral derivative, PID)的温度控制方法或本领域技术人员已知的其他算法温度控制来调节。

[0068] 现有的系统利用位于可重复使用的仪器中的主动加热和冷却装置来实现发生在一次性检测盒中的核酸扩增的温度控制,这必然需要这样的仪器,所述仪器足够精密以能够可靠地形成与可去除的一次性检测盒的可重现的热接触。这导致增加的仪器成本和复杂性,以及所述仪器的温度控制子系统与所述一次性检测盒的流体子系统之间的热界面的可靠性降低。与这些系统不同,本发明的实施方案优选地包括放置在设备的一次性部分上的用于温度控制的电阻加热元件,如在图11中所示以及上文所述的那些。将加热元件和相对应的温度传感器放置在一次性部件上允许制备在温度控制子系统与和它们接口的扩增室和检测室之间的高度可重现的热耦联。这种方法通过在制造过程中形成导热界面而允许高度可靠的耦合流体子系统与电子热控制子系统的方式。所产生的在电子温度控制部件和流体子系统之间的良好的热接触导致快速的温度平衡,以及因此导致快速的测定。

[0069] 所述扩增室的实施方案优选地包括能够耐受重复加热和冷却至约30°C至约110°C范围内的温度的材料。甚至更优选地,所述扩增室包括能够耐受以约10°C至约50°C/秒量级的温度变化速率重复加热和冷却至约30°C至约110°C范围内的温度的材料。所述扩增室优选地能够使其中的溶液保持在适于热循环(图4A-D)或等温扩增流程(图4E)的温度,这取决于微控制器的编程。在一些核酸扩增应用中,理想地提供在升高的温度的初始温育,例如,在约37°C和约110°C之间的温度温育1秒-5分钟的时间,以使靶核酸变性。然后,反应液在至少两个温度之间的温度变化,包括,但不限于,导致核酸双链体变性的温度和适于通过与靶标杂交的引物退火和通过聚合酶催化的核酸聚合的引物延伸的温度。在热循环方案中,在每个必需的温度温育的持续时间可以随靶核酸的序列组成和反应混合物的组成而变化,但是优选地在约0.1秒和约20秒之间。重复的加热和冷却典型地进行约20个循环至约50个循环。在涉及等温扩增方法的实施方案中,取决于所用的扩增技术,反应液的温度保持在恒定温度(在一些情形中,在升高的温度的初始温育之后)持续约3分钟至约90分钟。一旦扩增反应完成,通过打开与标记室连通的排气口而使扩增反应液转运到位于所述扩增室下方的标记室中。

[0070] 在一些实施方案中,可以在扩增反应之前、过程中或之后,在扩增室中进行另外的生化反应。这样的过程可以包括,但不限于,反转录,其中将RNA转录为cDNA,多链体,其中多个引物对同时扩增多个靶核酸,和实时扩增,其中在扩增反应过程中检测扩增产物。在后一种情形中,扩增室可以不包含阀门或出口通道,并且扩增室优选地包括光学窗口或另外设

置为能够在扩增反应过程期间查询扩增子浓度。在一个实时扩增实施方案中,通过激发光源如LEDs或二极管激光和检测器如光电二极管以及适当的光学元件(包括但不限于滤光器)的方式监测荧光标记的与靶核酸互补的寡核苷酸或对双链体DNA特异的荧光染料的荧光强度。

[0071] 在本发明的备选实施方案中,使用电阻加热使各装置室内的气体膨胀来促使流体移动(图5)。例如,通过加热扩增室30,室内的气体膨胀并且将通过排气通道(在该情形中为入口通道40)作为气泡120溢出。在本发明的一些实施方案中,下游室的这种加热可以用来产生足够的气泡,足以混合在上游室(如样品室10)的流体体积中存在的试剂。一旦加热元件关闭,扩增室30内的气体冷却并且收缩,将流体125从上部样品室10吸到扩增室30中。通过重复该过程数次,整个流体体积可以被从一个室导入到另一个室中。在本发明的备选的实施方案中,这样的机构可以与电阻器排气机构联合使用来驱除流体体积。

[0072] 所述标记室的实施方案优选地为在扩增室中产生的扩增靶核酸提供特异性的标记,并且与检测室联合工作来提供检测的分析结果。如图6A中所示,标记室90可以包含检测粒子130,所述检测粒子为干燥的、冻干的、或作为在载体(如多糖、去污剂、蛋白或本领域技术人员已知的其他促使检测粒子重悬的化合物)中的干燥的检测粒子混合物而存在于内表面的至少一部分上。标记室优选地与来自扩增室30的入口通道135、通向检测室的出口通道140和通向排气袋的排气通道150连接,如上所述。入口通道135典型地是与扩增室30的出口通道45相同的通道。在与PCA的接口处,优选地在标记室的一面与电阻加热元件之间布置薄层导热材料,如导热油脂。

[0073] 适当的检测粒子包括,但不限于,对双链体核酸特异的荧光染料,荧光修饰的寡核苷酸,或寡核苷酸-缀合的染色的微粒或胶体金。扩增子的检测包括‘检测寡核苷酸’或其他与待检测的扩增子互补或另外能够特异性结合待检测的扩增子的‘检测探针’。可以通过使用链霉抗生物素包被的颗粒和生物素化的寡核苷酸,或通过碳二亚胺化学,其中羧基化的颗粒在存在碳二亚胺的条件下活化并且特异性与检测寡核苷酸中存在的伯胺反应,而发生检测寡核苷酸与微粒的缀合。检测寡核苷酸与可检测结构部分的缀合可以在内部或在5’端或在3’端发生。检测寡核苷酸可以直接连接在微粒上,或更优选地通过间隔结构部分如乙二醇或多核苷酸连接。

[0074] 在双链体DNA扩增产物的情形中,在引入检测室后加热反应液促进检测。解链双链体DNA,然后在检测寡核苷酸的存在下冷却,导致对所扩增的靶核酸的序列特异性的标记。在标记室下方的电阻元件可以用于加热流体体积约1秒至约120秒,以起始双链体DNA的解链。当允许溶液冷却至室温时,所扩增的靶核酸可以与检测微粒特异性杂交。然后,通过打开检测室的排气口,反应体积优选地被导向在标记室下方的检测室区域。

[0075] 为了发生有效的标记,溶解的检测粒子优选地与反应液充分混合。在本发明的实施方案中,在标记过程中可以使用涉及电阻加热器的第二混合方法,以使双链的核酸靶变性,并且使检测微粒充分混合在反应液中。加热标记室中的溶液至沸点以上可以用来诱导溶液中的湍流和混合。通过纹理特征,如激光蚀刻的线条132,图6B所示(或一系列的所述线条)而在室的底部和侧面核化的上升的气泡优选有效地搅拌所述溶液。已经证明这种作用在多种高度下起作用,不依赖于相应的沸点温度变化。在随后的冷却过程中,任何通过沸腾排到上部室中的溶液优选地向下流回到标记室中。在本发明的一些实施方案中,内面或

标记室壁的区域可以是有纹理的或另外被处理以使泡核沸腾局限于特定的室壁或面上。在其他实施方案中,在标记室中可以放置一个或多个沸腾石,以使泡核沸腾局限于特定的一个或多个点。

[0076] 本发明的检测室的实施方案提供对已在标记室中标记的所扩增的靶核酸的特异性检测。在本发明的某些实施方案中,检测是这样实现的:通过经由由多孔材料(如纤维素、硝基纤维素、聚醚砜(polyethersulfone)、聚偏1,1-二氟乙烯(polyvinylidene fluoride)、尼龙、电荷改性的尼龙或聚四氟乙烷)组成的吸收条毛细管芯吸包含标记的扩增子的溶液而完成检测,所述吸附条形成线条、点或其他视觉上能区分的元件的图案,并且包括能够直接或间接与所标记的扩增子特异性结合的结合结构部分。在一些实施方案中,所述装置的吸收条部件包括至多三个多孔基底,其与下述物理接触:表面活性剂垫,其包含两亲试剂以增强芯吸;检测带,其包含多孔材料(诸如纤维素、硝基纤维素、聚醚砜、聚偏1,1-二氟乙烯、尼龙、电荷改性的尼龙或聚四氟乙烷),其固定化有至少一种能够选择性结合所标记的扩增子的结合结构部分;和/或吸收垫,以提供另外的吸收能力。与之前描述的侧流检测装置不同,检测粒子优选不结合在检测室中的侧流多孔材料中,相反保持在标记室上游,在所述标记室中,基本上增强扩增子与检测粒子之间的结合复合物的形成的操作,如加热/煮沸,可以在向所述装置的多孔部件引入所产生的标记的核酸之前进行。

[0077] ‘捕获寡核苷酸’或‘捕获探针’优选地通过本领域技术人员已知的多种方式中的任一种,如UV辐照,固定化在所述装置的检测条元件上。设计捕获探针以在包含标记的核酸的溶液芯吸通过捕获带时捕获所述标记的核酸,这导致在捕获探针固定位点的标记浓度增加,因此产生指示所述标记的靶核酸扩增子的存在的可检测的信号。单一检测条可以用一种或多种捕获探针图案化,以允许多种扩增子的多路检测,确定扩增子的序列,和测定质量控制(阳性和阴性对照)。

#### [0078] 流体子组件层

[0079] 流体子组件的实施方案的部件优选地包括塑料,如丙烯酸塑料、聚碳酸酯、PETG、聚苯乙烯、聚酯、聚丙烯和/或其他类似的材料。这些材料可容易获得,并且能够通过标准方法制备。如图3和7所示,流体子组件包括室和通道。流体室由壁、两个面160组成,并且与一个或多个通道连接,所述通道如入口、出口或排气口。通道可以连接两个流体室,并且由壁和两个面组成。流体室设计优选地使表面积与体积的比率最大化,以促进加热和冷却。室的内部体积优选在约1 $\mu$ L与约50 $\mu$ L之间。与溶液接触的室面160的面积优选与加热元件所接口的面积相对应,以确保在加热过程中流体温度均匀。可以选择流体室的形状与加热元件紧密配合,并且提供溶液进入和流出的有利的几何形状。在一些实施方案中,室的体积可以大于流体体积,从而为在操作装置的过程中出现的气泡提供空间。流体室可以具有通往排气通道的扩大的延伸,以确保流体不通过毛细管作用侵占通道或另外阻塞排气机构。这些室与排气通道连通的各部分可以任选地包括一个或多个不润湿的或疏水性的面,以进一步减少流体侵入到排气通道中。

[0080] 在一些实施方案中,每个流体子组件包括三个层压的塑料片,其中一个部件200形成流体室的壁,另外两个面部件210,220层压成到第一个以形成面。面部件210可以任选地包含孔洞212用于观察LED指示器214。面部件220优选地包含冻干的试剂20、检测粒子130和检测条组件230,并且优选地通过粘合垫片222与PCB75接口,所述粘合垫片可以包括具有粘

合剂边界224的膜。在备选的实施方式中,每个流体子组件可以包括两个塑料部件,其中一个部件形成壁和一个面,另一个部件层压到第一个上以密封室并且形成第二个面。在本发明的实施方式中,流体子组件的塑料部件可以通过工业激光-或水喷射切割、冲孔或冲压工艺以及注塑的方式制造。

[0081] 在本发明的一些实施方式中,流体室和通道壁的厚度在约0.025mm-约1mm的范围内,优选在约0.1mm-约0.5mm的范围内。该厚度优选地满足流体层的结构完整性和支持在高温和相关压力下对密闭室的密封的需要。通道壁的厚度,特别是排气通道壁的厚度,优选小于室的厚度,并且在约0.025mm-约0.25mm的范围内。优选选择入口和出口通道的宽度来增加毛细管作用。浅的排气通道对流体层赋予增加的刚性,对排气至大气压没有不利作用。形成流体层的面的塑料优选比形成壁的薄,从而使热传递最大化。可选的热敏断点170切割通过流体层的一些部件,并且围绕扩增室和检测室,有助于温度控制室的热隔离。

[0082] 用于流体层的组件的塑料,诸如丙烯酸塑料和聚酯,优选地包括疏水性材料。在本发明的实施方式中,可以处理流体层的部件以增强湿润性(即,降低疏水性)。所述处理与流体通道尺寸联合确保适宜的流体控制。在一些实施方式中,可以对无涂层的材料应用生物相容性表面活性剂,如Triton X-100。等离子体放电处理(Plasma discharge treatment)是另一种可选的处理,以改变流体接触表面的疏水性。

[0083] 在本发明的一些实施方式中,可以使用双面粘合膜来密封流体层的多个部件。粘合膜,诸如包括粘合垫片222或膜224的粘合膜,在三部件流体层的情形中,用于内部部件的侧面,或者在两部件流体层的情形中,用于一个侧面。在面部件220加入到其他层之前,可以结合流体层的另外的部件如检测条组件230、检测粒子130和冻干试剂20。在一些实施方式中,可以通过施加压力而层压部件,以确保良好的粘附。必须避免已知或发现不利地影响核酸扩增反应的性能的粘合剂。基于丙烯酸或硅的粘合剂已经成功地用于本发明。一种优选的粘合膜是由Advanced Adhesives Research供应的SI7876。可以使用其他粘合剂,条件是发现与所用的缓冲剂、塑料和反应化学品化学相容,同时在装置操作过程中遇到的温度范围内提供稳健的密封。

[0084] 参考图2和3,排气袋优选地在其构造时与其他室区分。在如上所述构造流体层时,排气袋具有在与PCA层75相接合的流体层的侧面上的开口面。为了形成排气袋,层压另外的塑料部件,以密封室,优选地包括薄的热不稳定的膜80,其具有用于贴附到与PCA的排气电阻器70相邻的流体层侧的一个粘合面。膜80包括厚度为约5 $\mu$ m-约200 $\mu$ m的聚烯烃,但是也可以使用其他类似的薄膜。该薄膜充分适合密封所述排气袋并且允许容易的穿孔,并且因此当电流通过排气电阻器产生快速的温度增加时,排气到大气。

[0085] 流体层的另外的成分

[0086] 如上述,在最终的层压和密封之前,一些另外的成分优选地结合在本发明的流体层中。包括缓冲剂、盐、dNTPs、寡核苷酸引物和酶如DNA聚合酶和反转录酶的试剂可以在装置组装之前冻干或冷冻干燥成小丸或饼状物。试剂冻干在本领域中是公知的,并且涉及通过在施加的真空下升华而对冷冻的试剂等分试样脱水。通过在冷冻之前向试剂中加入特定的低温保护剂(如糖(二糖和多糖)和多元醇)的制剂,可以保持酶的活性,并且可以提高再水合率。冻干的试剂小丸或饼状物通过标准方法制备,并且一旦形成,是相当耐用的,并且可以在层压最终的面之前容易地放置在流体层的特定的室中。

[0087] 在本发明的一些实施方案中,检测微粒是流体层的另一种另外的成分。在一些实施方案中,这些微粒可以如上文关于反应试剂所述冻干。在其他实施方案中,在液体缓冲液中的微粒可以在密封之前直接涂覆到流体室的内面上并且干燥。包含微粒的液体缓冲液优选地还包含辅助再水合的糖或多元醇。在干燥之前,将在水性缓冲液中的微粒直接结合在流体层中可以简化并且降低制造的最终成本,并且可能需要如上文所述的加热或泡核沸腾以充分混合所述微粒与反应液,并且使双链核酸产物变性以与检测粒子杂交。

[0088] 在本发明的一些实施方案中,在流体层中还结合有侧流检测条组件。所述检测条优选地包含由至少一种多孔成分组成的膜组件,并且任选地可以包含吸收剂垫、检测膜、表面活性剂垫和背衬膜。所述检测膜由硝基纤维素、纤维素、聚醚砜、聚偏1,1-二氟乙烯、尼龙、电荷改性的尼龙或聚四氟乙烷制成,并且可以背衬有塑料膜。如上述,捕获探针可以以线状、点状或可以通过人肉眼观察到的任何图案沉积并且可逆地固定化在检测膜上。沉积的寡核苷酸可以通过在捕获探针沉积后用UV辐照所述检测膜而被永久固定化。所述表面活性剂垫可以包含多孔基底,优选地具有最小的核酸结合和流体保持特性,这允许核酸产物和检测微粒的不受阻挡的迁移。表面活性剂垫可以包含诸如玻璃纤维、纤维素或聚酯的材料。在本发明的实施方案中,包括至少一种两亲试剂的制剂在所述表面活性剂垫上干燥,以允许样品通过所述检测膜的均匀的迁移。吸收剂垫可以包含任意的吸收材料,并且帮助诱导样品通过检测膜组件的芯吸。使用粘合背衬膜,诸如双面粘合膜作为基底,所述检测膜部件通过先放置所述检测膜,然后放置任选的吸收剂垫和/或表面活性剂垫与所述检测膜物理接触,具有约1mm-约2mm的重叠。

#### [0089] 电子子组件层

[0090] 在一些实施方案中,尽管可以使用其他的标准板材料和厚度,但是,印刷电路板(PCB)包含标准0.062英寸厚的FR4覆铜箔层压板材料。电子元件,如电阻器、电热调节器、LEDs和微控制器,优选地包括现成的表面贴装元件(SMDs),并且按照工业标准方法放置。

[0091] 在备选的实施方案中,PCA可以与盒壁整合,并且包括柔性塑料电路。可以使用诸如PET和聚酰亚胺的柔性电路材料。使用柔性塑料电路在本领域中是公知的。在另一个实施方案中,加热元件和温度传感器可以是利用由诸如Soligie, Inc.的公司开发的技术被丝网印制到塑料流体层上。

[0092] 在本发明的一些实施方案中,在围绕电阻加热器的区域中的PCB厚度以及铜的量和放置适合于流体层中反应液的热管理。这可以通过使用已经提及的标准制造技术来实现。

[0093] 图2和图3显示了示例性的电阻器加热器组件。在本发明的一些实施方案中,尽管可以使用其他的电阻器,但是,电阻器是厚膜2512包。流体层中的加热室优先采用与电阻器的尺寸相似的尺寸,以确保在整个室中的均匀加热。假设流体层的厚度为0.5mm,这种尺寸的单个电阻器足以加热约15 $\mu$ L的溶液。图3中的示意图显示假设流体层的厚度为0.5mm时形成足以加热约30 $\mu$ L溶液的加热器的两个电阻器100。在这种情形中,电阻器优选每个为40ohm,并且以平行构型排列。

[0094] 在本发明的一些实施方案中,温度传感器110优选地包括电热调节器,诸如0402NTC装置,其高度与2512电阻器包的高度相似。在一个电阻器或两个电阻器设置的情形中,所述电热调节器分别优选地邻近电阻器加热器或在电阻器加热器之间排列;例如,参见

图8。通过紧密排列这些电子元件,在它们之间仅有非常薄的空气隙产生。此外,在组装流体层与电子层之前应用导热化合物确保在流体层、电阻器和电热调节器之间良好的热接触。

[0095] 在本发明的一些实施方案中,尽管可以使用类似的电阻器,但是,排气电阻器70是厚膜0805包。

[0096] 在本发明的一些实施方案中,微控制器是AVR Atmega32。所述微控制器优选地与流体系统的复杂性相匹配。例如,使用多路,单个排气口和加热器的数目与微控制器I/O线路的数目相称。可以选择存储器大小以适应程序的大小。

[0097] 在本发明的某些实施方案中,使用以开-关(ON-OFF)模式操作的SOT-23包中的N-通道MOSFETs来调制到排气口和加热器电阻器的电流负荷。调制信号通过微控制器发送。在备选的实施方案中,对于更高级的流体热管理,可以使用脉冲-宽度-调制方案和其他控制算法。这将典型地通过微控制器处理,并且可能需要本领域技术人员已知的另外的硬件和/或软件特征。

#### [0098] 最终装置组装

[0099] 流体、电子器件和壳体部件最终组装成成品装置优选地通过层压流体层250和电子层75开始,以确保在PCA加热元件与流体层中存在的室和/或袋之间良好的热接触。如图9所示,粘合垫片222将这两层粘合在一起,并且确保扁平的流体层和PCA上存在的形貌凸起的电子元件之间的水平接触(level contact)。可以在层压之前在加热元件上放置导热化合物或油脂,以进一步改善热接触。在组装流体层和电子层后,可以固定一个保护性塑料壳体,以产生最终的装置。

[0100] 取决于应用,本发明的不同实施方案可以具有最大实用性。一些实施方案包括这样的装置,其中小的控制基座部件操作包含核酸扩增和检测系统的更小的一次性部件。该具体的实施方案帮助降低单次诊断检测的成本。为此目的设计的代表性装置显示在图10中。如上文所述,所述装置电子功能优选分成两个独立的子组件。一次性子组件260包括插头连接器(pin connector)270或其他类似的电子连接器和低成本电子元件,如扩增室加热元件100,标记室加热元件265,排气口加热元件70,温度传感器,诸如电热调节器,和可选的LED指示器214,包括直接与流体系统部件相互作用的那些部件。连接器270优选地沿着电源线和到电热调节器的信号线向电阻加热器提供电流。可重复使用的子组件或基座部件280优选地结合可重复使用的部件,如微控制器、MOSFETs、转换器、电源或电源插口275和/或电池、任选的冷却风扇、任选的用户界面和与一次性子组件260的连接器270兼容的连接器272。当子组件通过连接器270和272配对时,基座部件280优选地支撑基本上处于垂直或接近垂直定向的一次性子组件260。尽管在本文所述的一些实施方案中,基本上垂直的定向是优选的,但是如果装置倾斜地操作,尤其是如果将某些路径包被以减少所用的溶液的润湿角,可以获得相似的结果。

[0101] 另一个实施方案包括这样的装置,其中整个组件是一次性的,如图11所示。在该实施方案中,只有通过9伏电池305供电的单个电子组件,所述电池优选地通过端子307连接在装置的背面,如图11C所示。微控制器300、功率调节电路302和MOSFETs310优选地也放置在装置的背面,如图11B所示,而与流体层接触并且显示在图11A中的对侧包括扩增室加热元件100、标记室加热元件265、排气口加热元件70和温度传感器。图11所示的装置设计来结合平行进行用于多路应用的两个反应(即扩增和标记反应)所需的室和其他部件。该具体的实

施方案对在遥远场所进行检测的应用是理想的。该装置可以备选地通过墙壁适配器或具有充分的电量的另一个电池或多个电池供电。

[0102] 为了提供完全的样品-到-结果的检测,本发明上述实施方案中的任一个可以与样品制备系统320接口,所述样品制备系统通过通道325将核酸作为输出提供到样品室10中。这已经用题目为“高度简化的基于侧流的核酸样品制备和被动流体流动控制(Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control)”的国际公布号W02009/137059A1中所述的样品制备技术进行了证明。产生的集成装置的实施方案显示在图12中。

[0103] 具有多个壁部件的流体子组件

[0104] 在一些实施方案中,如在图7中所示,流体子组件可以包括三个层压的塑料片,其中一片形成流体室的壁,另外两个部件层压到第一个上以形成面。在备选的实施方案中,流体子组件可以包括两个塑料部件,其中一个部件形成壁和一个面,而另一个部件层压到第一个上以密封室并且形成第二面。在本发明的实施方案中,流体子组件的塑料部件可以通过工业激光-或水-喷射切割、冲孔或冲压工艺以及注塑的方式制造。在其他备选的实施方案中,流体子组件可以包括层压层,以使检测室位于所述装置的单独的层中,从而使其放置在包括扩增室和标记室的层的前面。这种物理构造减少装置的宽度,同时还赋予另外的功能性。具体地,该实施方案将检测条放置在检测室中,以使其位于标记室上方。这允许使用在所述标记室下方的加热器元件(在测定的检测步骤过程中)来控制所述检测室中的温度。控制检测室的温度允许在与检测条杂交的过程中使用升高的温度。在基于杂交的检测过程中温度介导的杂交严格性的调节可以用来获得提高的杂交特异性,例如,这在区分密切相关的核酸序列(例如,单核苷酸多态性)时是有用的。

[0105] 图13显示本发明的一个实施方案的多层流体盒式组件290的各部件,如刚刚在上文所述的。第一壁部件300包括用于容纳检测条305的检测室302和样品室的部分304。第二壁部件310包括样品室的另一部分306、扩增室314、标记室316、排气袋318和相应的通道。三个面部部件330,335,340形成室、袋和通道。面部部件335作为壁部件300的背面和壁部件310的前面,并且包括用于形成样品室的开口303和用于使包含标记的靶核酸的溶液从标记室316转运到检测室302的开口345。该部件层优选地用硅氧烷转移粘合剂粘合在一起。优选地处理内表面以控制润湿。在制造过程中优选地加入试剂、包括检测条305的侧流组件和热熔性热塑排气阀门320。粘合膜优选地密封在排气袋上。

[0106] 图14显示结合图13的流体层290的一次性测定检测盒350的分解图。测定检测盒350包括前壳、微流体盒式组件290、粘合带360、电路板370和后壳380。图15是放置在坞站400中的一次性PCA/流体组件350的示例。样品通过样品端口390加入到样品室中。所述坞站优选地包含控制电子器件和电源,并且可以包括启动测定所需要的电子过程的按钮。

[0107] 实施例1:用于诊断柑桔中的韧皮部杆菌感染的扩增和检测靶核酸的方法

[0108] 其中一次性部件与可重复使用的坞站接口的本发明的实施方案用来检测柑桔叶片组织是否存在柑桔黄龙病菌亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*),其为柑桔黄龙病的致病因子。

[0109] 构建上述的部分一次性的装置。可重复使用的部件包括标准1.5oz的覆铜箔PCB。电路元件包括ATmega328微控制器、0.5Amp N-通道MOSFETs、SMD电阻器和功率调节元件。立



体平版印刷(stereolithography, SLA)形成的塑料壳覆盖板和触摸开关。母插头连接器贴在顶部表面上以允许与一次性PCA的竖直连接。一次性PCA包括类似的PCB以及厚膜电阻器、0402电热调节器和0603LEDs。在板的一个端部放置直角公插头连接器,以在插入到可重复使用部件的内插座中时允许垂直定向放置。

[0110] 流体层包括两个面部件、壁部件和薄膜。面部件由0.004”聚酯(PET)制成。壁部件由层压了Advanced Adhesives, Inc.的0.002”硅氧烷转移膜的0.5mm丙烯酸塑料制成。排气口膜由具有3M公司的0.004”耐溶剂型丙烯酸胶粘剂的0.0005”聚烯烃制成。用Universal Laser Systems, Inc.的VersaLaser3.5激光切割器将单个部件切割成型。在组装之前,除了膜部件之外的所有激光切割的塑料流体部件都放置在含有100mM氢氧化钠和0.1%十二烷基硫酸钠的超声浴中,并且超声处理30分钟,以去除任何的碎片、污染的核酸或核酶。清洁过的塑料部件最后用不含核酶的水洗涤。壁和面部件(面向PCA的)先通过施加5000psi压力进行层压。在500mM蔗糖中的检测寡核苷酸缀合的聚苯乙烯珠沉积在标记室中,并且在真空下干燥。干燥后,将一段双面胶放置在检测室中,并且用硝基纤维素膜条、Accuflow-P表面活性剂垫和印迹纸组装检测膜部件,以作为吸收剂垫。在一些情形中,将由反应酶和赋形剂组成的冻干的珠子添加到样品室中。最后,用另一个面部件密封流体层,并且层压排气膜部件以密封排气袋。将硅氧烷导热化合物(Radio Shack, Inc.)轻轻涂覆到扩增和标记电阻器上,并且使用粘合垫片层压流体层和电子层。

[0111] 在完成装置组装后,向样品室中加入28L的反应混合物。取决于实验,向该反应混合物中加入液体形式的扩增所需要的酶(图16A),或所述酶存在于结合到流体层的样品室中的冻干的饼状物中(图16B)。在这两种情形中,所用的核酸模板用QIAshredder和吸附柱试剂盒(Qiagen, Inc.)从感染的植物组织提取。使用引物hyv1\_For和hyv1\_Rev来扩增139bp的核酸序列,用于诊断植物致病性细菌柑桔黄龙病菌亚洲种的存在。使用预制的扩增缓冲液(10X)(含有400mM Tris-HCl(pH8.4), 10mM硫酸铵, 100mM氯化钾和0.25% Triton X-100)进行专有技术的扩增反应化学。每20L反应液包含:

[0112] 9.4μL水

[0113] 2.0μL10x扩增缓冲液

[0114] 2.0μLDMSO

[0115] 0.4L氯化钾(2M)

[0116] 0.5L氯化镁(100mM)

[0117] 0.5μL二硫苏糖醇(100mM)

[0118] 0.5μLdNTPs(10mM)

[0119] 2.0μL引物组hyv1\_For和hyv1\_Rev(每种8μM)

[0120] 0.5μLVentR(exo-)DNA聚合酶(2U/μL)\*

[0121] 0.2μLEt SSB, 极端热稳定性单链结合蛋白(500μg/mL)\*

[0122] 2.0μL提取自健康的或感染韧皮部杆菌(*C. Liberibacter*)的组织的DNA(17.2ng/μL)

[0123] \*包含在溶液中,或者,在使用冻干的酶的情形中,用水替代。

[0124] 扩增室的排气以及扩增和检测程序的起始通过按压在可重复使用部件上作为起始按钮的触摸开关实现。排气后,反应液进入扩增室中,在所述扩增室中,溶液被加热至85

℃持续2分钟,然后是40个循环:76℃10秒和60℃25秒。在完成热循环后,通过微控制器起始的排气允许反应物流到标记室中。标记室包含蓝色染色的聚苯乙烯检测微球体,其在存在500mM蔗糖的条件下干燥在标记室的一个内面上。与染色的微球体缀合的检测寡核苷酸与核酸扩增产物的有义链互补。将标记室加热至105℃持续2分钟,然后维持在90℃30秒,以诱导聚苯乙烯珠的沸腾和彻底的混合,并且使双链的DNA产物变性。加热后,允许标记室中的反应液冷却两分钟。对检测室排气,使得溶液从标记室流到检测室中并且流到检测条组件上。三条捕获线固定在侧流膜上;从装置的底部开始,它们为:不与任何测定的靶标互补的阴性对照寡核苷酸;与扩增产物互补的捕获探针;和与检测探针互补的阳性对照寡核苷酸。可以从图16中清楚地看出,本发明成功地扩增并检测了靶核酸,没有与阴性对照线的可检测的交叉杂交。

[0125] 所用的扩增引物的序列为:

[0126] hyv1\_For

[0127] ggccgttttta acacaaaaga tgaatatcat agatggggta gtcaa(SEQ ID N01)

[0128] hyv1\_Rev

[0129] cggccattttt agataaatca atttgtttcta gtttagatac atcaatttgt t(SEQ ID N02)

[0130] 所用的捕获和检测寡核苷酸的序列为:

[0131] 捕获

[0132] tcgtttgagt agctagatcc nnnnnnnnnn nt(SEQ ID N03)

[0133] 检测

[0134] /5AmMC12/aattgatgga tgacgtgata gtttagacc aacatctt/3Phos/(SEQ ID N04)

[0135] 扩增过程的更完整的描述可见于题目为“用于核酸的振荡扩增反应(Oscillating Amplification Reaction for Nucleic Acids)”的共同所有的美国临时专利申请系列号61/477,437,其通过引用结合于此。该过程允许以较高灵敏度使用较大的溶液体积,并且不需要主动冷却来进行热循环。由于该过程只需要被动冷却,狭窄的循环温度范围,并且基本上不受比PCR中典型所用的那些更宽的温度容限的影响,所以可以使用简单的电阻加热元件,因此允许所述装置是紧凑的且便宜的。此外,由于扩增室在与加热电阻器相邻的侧面优选是扁平的,由此提供良好的热接触,因此,可获得优异的热耦合。这种热界面可以通过使用导热粘合剂化合物而增强。

[0136] 实施例2:用于诊断柑桔中的韧皮部杆菌感染的分离、扩增和检测靶核酸的方法

[0137] 构建上述的部分一次性的装置。可重复使用的部件包括标准1.5oz的覆铜箔PCB。电路元件包括ATmega328微控制器、0.5Amp N-通道MOSFETs、SMD电阻器和功率调节元件。立体平版印刷(SLA)形成的塑料壳覆盖板和触摸开关。母插头连接器贴装在顶部表面上以允许与一次性PCA的竖直连接。一次性PCA包括类似的PCB以及厚膜电阻器、0402电热调节器和0603LEDs。在板的一个端部放置直角公插头连接器,以在插入到可重复使用部件的内插座中时提供垂直定向。

[0138] 流体层包括两个面部件、壁部件和薄膜。面部件包含0.004”聚酯。壁部件包含层压了Advanced Adhesives, Inc.的0.002”硅氧烷转移薄膜的0.5mm丙烯酸塑料。为了适应流体层与样品制备子系统的集成,构造壁和面部件来提供这样放置的开口和通道,以使当层压到样品制备子系统上时,纯化的核酸将在样品制备过程的洗脱相过程中与本发明的样品室

连通。排气口膜由具有3M公司的0.004”耐溶剂型丙烯酸胶粘剂的0.0005”聚烯烃制成。用Universal Laser Systems, Inc.的VersaLaser3.5激光切割器将单个部件切割成型。在组装之前,除了膜部件之外的所有激光切割的塑料流体部件都放置在含有100mM氢氧化钠和0.1%十二烷基硫酸钠的超声浴中,并且超声处理30分钟,以去除任何的碎片、污染的核酸或核酶。清洁过的塑料部件最后用不含核酶的水洗涤。壁和面部件(面向PCA的)先通过施加5000psi压力进行层压。在500mM蔗糖中的检测寡核苷酸缀合的聚苯乙烯珠沉积在标记室中,并且在真空下干燥。干燥后,将一段双面胶放置在检测室中,并且用硝基纤维素膜条、Accuflow-P表面活性剂垫和印迹纸组装检测膜部件,以作为吸收剂垫。在一些情形中,将由反应酶和赋形剂组成的冻干的珠子添加到样品室中。最后,用另一个面部件密封流体层,并且层压排气膜部件以密封排气袋。将硅氧烷导热化合物(Radio Shack, Inc.)轻轻涂覆到扩增和标记电阻器上,并且使用粘合垫片层压流体层和电子层。

[0139] 与本发明的流体层接口的样品制备子系统由激光切割的丙烯酸塑料制造,所述丙烯酸塑料被层压以形成缓冲液储库和对所述子系统的吸收剂材料成分的物理支撑。被动的缓冲液交换结构以题目为“高度简化的基于侧流的核酸样品制备和被动流体流动控制(Highly Simplified Lateral Flow-Based Nucleic Acid Sample Preparation and Passive Fluid Flow Control)”的国际公布号W02009/137059A1中所述的几何形状切割。使用无纺尼龙作为缓冲液交换材料。使用Whatman GF/B玻璃纤维滤器作为核酸亲和基质。使用棉纱布作为吸收剂垫来提供适当容量的吸收剂池(absorbent sink)。

[0140] 将植物组织,特别是从柑桔属叶柄附近的叶片中脉收集的四个1.5mm组织活检穿孔片,在微量离心管中在150 $\mu$ L提取缓冲液(4M硫氰酸胍,25mM tris,pH6.4)中简单碾碎。将得到的粗提取物引入到样品制备子系统的样品储库中,然后立即向其各自的储库中加入200 $\mu$ L洗涤缓冲液1(2M硫氰酸胍,30%乙醇,25mM tris,pH7.4)和800 $\mu$ L洗涤缓冲液2(400mM NaCl,50%乙醇,50mM tris,pH6.4)。加入样品后15分钟,样品制备部件的核酸结合基质被“穿孔”到下方的洗脱室中,并且用50 $\mu$ L反应缓冲液洗脱核酸。通过经由在亲和基质上面的洞推压1cc结核菌素注射器(没有针头)完成穿透(Punch-through)和反应缓冲液注射,从而将所述基质排出到下方的洗脱室中。该洗脱室与本发明的样品室通过在专门设计的流体层中的通道相连接。挤压注射器活塞导致捕获的核酸洗脱下来,洗脱下来的核酸通过所述通道流到样品室中。

[0141] 除了不包含酶,洗脱缓冲液包含通过专有扩增技术进行靶标扩增所需要的所有试剂,包括引物hyv1\_For和hyv1\_Rev,所述引物选择性扩增用于诊断植物致病性细菌柑桔黄龙病菌亚洲种的存在的139bp的序列。预先制备扩增缓冲液(10X),其含有400mM Tris-HCl (pH8.4),10mM硫酸铵,100mM氯化钾和0.25%Triton X-100。每20 $\mu$ L洗脱缓冲液包含:

[0142] 12.1 $\mu$ L水

[0143] 2.0 $\mu$ L10x扩增缓冲液

[0144] 2.0 $\mu$ LDMSO

[0145] 0.4 $\mu$ L氯化钾(2M)

[0146] 0.5 $\mu$ L氯化镁(100mM)

[0147] 0.5 $\mu$ L二硫苏糖醇(100mM)

[0148] 0.5 $\mu$ LdNTPs(10mM)

[0149] 2.0 $\mu$ L引物组hyv1\_For和hyv1\_Rev(每种8 $\mu$ M)

[0150] 在对所述装置通电之前,向样品室中的洗脱的核酸样品中加入下述酶,并且使用凝胶上样移液管头简单混合。

[0151] 1.0 $\mu$ LVentR(exo-)DNA聚合酶(2U/ $\mu$ L)

[0152] 0.4 $\mu$ LEt SSB,极端热稳定性单链结合蛋白(500 $\mu$ g/mL)

[0153] 扩增室的排气以及扩增和检测程序的起始通过按压在可重复使用部件上作为起始按钮的触摸开关实现。排气后,反应液进入扩增室中,在所述扩增室中,溶液被加热至85 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后是40个循环:76 $^{\circ}$ C10秒和60 $^{\circ}$ C25秒。在完成热循环后,通过微控制器起始的排气允许反应物流到标记室中。标记室包含蓝色染色的聚苯乙烯检测微球体,其在存在500mM蔗糖的条件下干燥在标记室的一个内面上。与染色的微球体缀合的检测寡核苷酸与核酸扩增产物的有义链互补。将标记室加热至105 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后维持在90 $^{\circ}$ C30秒,以诱导聚苯乙烯珠的沸腾和彻底的混合,并且使双链的DNA产物变性。加热后,允许标记室中的反应液冷却两分钟。对检测室排气,使得溶液从标记室流到检测室中并且流到检测条组件上。三条捕获线固定在侧流膜上;从装置的底部开始,它们为:不与任何测定的靶标互补的阴性对照寡核苷酸;与扩增产物互补的捕获探针;和与检测探针互补的阳性对照寡核苷酸。可以从图14中清楚地看出,完全集成的装置产生成功的核酸分离、扩增和靶核酸的检测。

[0154] 实施例3:用于诊断柑桔中的韧皮部杆菌感染的扩增和检测靶核酸的方法

[0155] 其中一次性部件与可重复使用的坞站接口的本发明的实施方案用来在无需之前的核酸分离步骤的条件下检测粗柑桔叶片组织提取物是否存在柑桔黄龙病菌亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*),其为柑桔黄龙病的致病因子。

[0156] 构建上述的部分一次性的装置。可重复使用的部件包括标准1.5oz的覆铜箔PCB。电路元件包括ATmega328微控制器、0.5Amp N-通道MOSFETs、SMD电阻器和功率调节元件。立体平版印刷(SLA)形成的塑料壳覆盖板和触摸开关。母插头连接器贴装在顶部表面上以允许与一次性PCA的竖直连接。一次性PCA包括类似的PCB以及厚膜电阻器、0402电热调节器和0603LEDs。在板的一个端部放置直角公插头连接器,以在插入到可重复使用部件的内插座中时允许垂直定向放置。

[0157] 流体层包括两个面部件、壁部件和薄膜。面部件由0.004"聚酯制成。壁部件由层压了Advanced Adhesives, Inc.的0.002"硅氧烷转移薄膜的0.5mm丙烯酸塑料制成。排气口膜包含具有3M公司的0.004"耐溶剂型丙烯酸胶粘剂的0.0005"聚烯烃。用Universal Laser Systems, Inc.的VersaLaser3.5激光切割器将单个部件切割成型。在组装之前,除了膜部件之外的所有激光切割的塑料流体部件都放置在含有100mM氢氧化钠和0.1%十二烷基硫酸钠的超声浴中,并且超声处理30分钟,以去除任何的碎片、污染的核酸或核酶。清洁过的塑料部件最后用不含核酶的水洗涤。壁和面部件(面向PCA的)先通过施加5000psi压力进行层压。在500mM蔗糖中的检测寡核苷酸缀合的聚苯乙烯珠沉积在标记室中,并且在真空下干燥。干燥后,将一段双面胶放置在检测室中,并且用硝基纤维素膜条、Accuflow-P表面活性剂垫和印迹纸组装检测膜部件,以作为吸收剂垫。在一些情形中,将由反应酶和赋形剂组成的冻干的珠子添加到样品室中。最后,用另一个面部件密封流体层,并且层压排气膜部件以密封排气袋。将硅氧烷导热化合物(Radio Shack, Inc.)轻轻涂覆到扩增和标记电阻器上,并且使用粘合垫片层压流体层和电子层。

[0158] 在完成装置组装后,向样品室中加入40 $\mu$ L的反应混合物。取决于实验,扩增所需要的酶在该反应混合物中以液体形式存在,或以结合到流体层的样品室中的冻干的饼状物存在。在这两种情形中,测定的试样由4 $\mu$ L粗柑桔组织提取物组成,所述粗柑桔组织提取物通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中碾碎5个直径为1.5mm的活组织穿孔片而制备。使用引物hyv1\_For和hyv1\_Rev来扩增139bp的核酸序列,用于诊断植物致病性细菌柑桔黄龙病菌亚洲种的存在。进行专有扩增反应化学。预先制备扩增缓冲液(10X),其含有400mM Tris-HCl (pH8.4),10mM硫酸铵,100mM氯化钾和0.25% Triton X-100。每40 $\mu$ L反应液包含:

[0159] 18.8 $\mu$ L水

[0160] 4.0 $\mu$ L10x扩增缓冲液

[0161] 4.0 $\mu$ L DMSO

[0162] 0.8 $\mu$ L氯化钾(2M)

[0163] 1.0 $\mu$ L氯化镁(100mM)

[0164] 1.0 $\mu$ L二硫苏糖醇(100mM)

[0165] 1.0 $\mu$ LdNTPs(10mM)

[0166] 4.0 $\mu$ L引物组hyv1\_For和hyv1\_Rev(每种8 $\mu$ M)

[0167] 1.0 $\mu$ LVentR(exo-)DNA聚合酶(2U/ $\mu$ L)\*

[0168] 0.4 $\mu$ LEt SSB,极端热稳定性单链结合蛋白(500 $\mu$ g/mL)\*

[0169] 4.0 $\mu$ L柑桔组织提取物,所述提取物通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中简单碾碎5个活组织穿孔片(直径为1.5mm,从柑桔叶柄或从邻近健康的或感染韧皮部杆菌的柑桔树的叶柄的中脉获得)或~4mm长的叶柄组织而产生

[0170] \*包含在溶液中,或者,在使用冻干的酶的情形中,用水替代。

[0171] 扩增室的排气以及扩增和检测程序的起始通过按压在可重复使用部件上作为起始按钮的触摸开关实现。排气后,反应液进入扩增室中,在所述扩增室中,溶液被加热至85 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后是40个循环:76 $^{\circ}$ C10秒和60 $^{\circ}$ C25秒。在完成热循环后,通过微控制器起始的排气允许反应物流到标记室中。标记室包含蓝色染色的聚苯乙烯检测微球体,其在存在500mM蔗糖的条件下干燥在标记室的一个内面上。与染色的微球体缀合的检测寡核苷酸与核酸扩增产物的有义链互补。将标记室加热至105 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后维持在90 $^{\circ}$ C30秒,以诱导聚苯乙烯珠的沸腾和彻底的混合,并且使双链的DNA产物变性。加热后,允许标记室中的反应液冷却两分钟。对检测室排气,使得溶液从标记室流到检测室中并且流到检测条组件上。三条捕获线固定在侧流膜上;从装置的底部开始,它们为:不与任何测定的靶标互补的阴性对照寡核苷酸;与扩增产物互补的捕获探针;和与检测探针互补的阳性对照寡核苷酸。本发明成功地扩增并检测了靶核酸,没有与检测条的阴性对照线的可检测的交叉杂交。

[0172] 实施例4:用于检测亚洲橘木虱(Asian Citrus Psyllid)(橘木虱(*Diaphorina citri* Kuwayama))中的韧皮部杆菌的扩增和检测靶核酸的方法

[0173] 其中一次性部件与可重复使用的坞站接口的本发明的实施方案如实施例3所述构造,并且用来在无需之前的核酸分离步骤的条件下检测由橘木虱(*Diaphorina citri* Kuwayama)制备的粗全昆虫提取物是否存在柑桔黄龙病菌亚洲种,其为柑桔黄龙病的制备因子。

[0174] 在一些情形中,将由反应酶和赋形剂组成的冻干的珠子添加到样品室中。在完成

装置组装后,向样品室中加入40 $\mu$ L的反应混合物。取决于实验,扩增所需要的酶在该反应混合物中以液体形式存在,或以结合到流体层的样品室中的冻干的饼状物存在。在这两种情形中,样品由4 $\mu$ L通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中碾碎5只完整的活橘木虱而制备的溶液组成。使用引物hyv1\_For和hyv1\_Rev来扩增139bp的核酸序列,用于诊断植物致病性细菌柑桔黄龙病菌亚洲种的存在。进行专有扩增反应化学。预先制备扩增缓冲液(10X),其含有400mM Tris-HCl(pH8.4),10mM硫酸铵,100mM氯化钾和0.25% Triton X-100。每40 $\mu$ L反应液包含:

- [0175] 18.8 $\mu$ L水
- [0176] 4.0 $\mu$ L10x扩增缓冲液
- [0177] 4.0 $\mu$ LDMSO
- [0178] 0.8 $\mu$ L氯化钾(2M)
- [0179] 1.0 $\mu$ L氯化镁(100mM)
- [0180] 1.0 $\mu$ L二硫苏糖醇(100mM)
- [0181] 1.0 $\mu$ LdNTPs(10mM)
- [0182] 4.0 $\mu$ L引物组hyv1\_For和hyv1\_Rev(每种8 $\mu$ M)
- [0183] 1.0 $\mu$ LVentR(exo-)DNA聚合酶(2U/ $\mu$ L)\*
- [0184] 0.4 $\mu$ LEt SSB,极端热稳定性单链结合蛋白(500 $\mu$ g/mL)\*
- [0185] 4.0 $\mu$ L全橘木虱(*Diaphorina citri* Kuwayama)提取物,通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中简单碾碎5只完整的昆虫而产生

[0186] \*包含在溶液中,或者,在使用冻干的酶的情形中,用水替代。

[0187] 扩增室的排气以及扩增和检测程序的起始通过按压在可重复使用部件上作为起始按钮的触摸开关实现。排气后,反应液进入扩增室中,在所述扩增室中,溶液被加热至85 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后是40个循环:76 $^{\circ}$ C 10秒和60 $^{\circ}$ C 25秒。在完成热循环后,通过微控制器起始的排气允许反应物流到标记室中。标记室包含蓝色染色的聚苯乙烯检测微球体,其在存在500mM蔗糖的条件下干燥在标记室的一个内面上。与染色的微球体缀合的检测寡核苷酸与核酸扩增产物的有义链互补。将标记室加热至105 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后维持在90 $^{\circ}$ C 30秒,以诱导聚苯乙烯珠的沸腾和彻底的混合,并且使双链的DNA产物变性。加热后,允许标记室中的反应液冷却两分钟。对检测室排气,使得溶液从标记室流到检测室中并且流到检测条组件上。三条捕获线固定在侧流膜上;从装置的底部开始,它们为:不与任何测定的靶标互补的阴性对照寡核苷酸;与扩增产物互补的捕获探针;和与检测探针互补的阳性对照寡核苷酸。本发明成功地扩增并检测了靶核酸,没有与检测条的阴性对照线的可检测的交叉杂交。

[0188] 实施例5:用于检测长春花(*neriwinkle*, *Catharanthus roseus*)中的韧皮部杆菌的扩增和检测靶核酸的方法

[0189] 其中一次性部件与可重复使用的坞站接口的本发明的实施方案如实施例3所述构造,并且用来在无需之前的核酸分离步骤的条件下检测粗长春花(*Catharanthus roseus*)组织提取物是否存在柑桔黄龙病菌亚洲种,其为柑桔黄龙病的致病因子。

[0190] 在一些情形中,将由反应酶和赋形剂组成的冻干的珠子添加到样品室中。在完成装置组装后,向样品室中加入40 $\mu$ L的反应混合物。取决于实验,扩增所需要的酶在该反应混合物中以液体形式存在,或以结合到流体层的样品室中的冻干的饼状物存在。在这两种情形中,样品由4 $\mu$ L通过各自在500 $\mu$ L不含核酶的水中碾碎5个直径为1.5mm的活组织穿孔片而

制备的溶液组成。活组织穿孔片从感染或未感染柑桔黄龙病菌亚洲种的长春花 (*Catharanthus roseus*) 获得。使用引物hyv1\_For和hyv1\_Rev来扩增139bp的核酸序列,用于诊断植物致病性细菌柑桔黄龙病菌亚洲种的存在。进行专有扩增反应化学。预先制备扩增缓冲液(10X),其含有400mMTris-HCl(pH8.4),10mM硫酸铵,100mM氯化钾和0.25%Triton X-100。每40 $\mu$ L反应液包含:

[0191] 18.8 $\mu$ L水

[0192] 4.0 $\mu$ L10x扩增缓冲液

[0193] 4.0 $\mu$ LDMSO

[0194] 0.8 $\mu$ L氯化钾(2M)

[0195] 1.0 $\mu$ L氯化镁(100mM)

[0196] 1.0 $\mu$ L二硫苏糖醇(100mM)

[0197] 1.0 $\mu$ LdNTPs(10mM)

[0198] 4.0 $\mu$ L引物组hyv1\_For和hyv1\_Rev(每种8 $\mu$ M)

[0199] 1.0 $\mu$ LVentR(exo-)DNA聚合酶(2U/ $\mu$ L)\*

[0200] 0.4 $\mu$ LEt SSB,极端热稳定性单链结合蛋白(500 $\mu$ g/mL)\*

[0201] 4.0 $\mu$ L长春花组织提取物,通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中简单碾碎5个直径为1.5mm的活组织穿孔片(取自长春花叶的叶柄)而产生

[0202] \*包含在溶液中,或者,在使用冻干的酶的情形中,用水替代。

[0203] 扩增室的排气以及扩增和检测程序的起始通过按压在可重复使用部件上作为起始按钮的触摸开关实现。排气后,反应液进入扩增室中,在所述扩增室中,溶液被加热至85 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后是40个循环:76 $^{\circ}$ C10秒和60 $^{\circ}$ C25秒。在完成热循环后,通过微控制器起始的排气允许反应物流到标记室中。标记室包含蓝色染色的聚苯乙烯检测微球体,其在存在500mM蔗糖的条件下干燥在标记室的一个内面上。与染色的微球体缀合的检测寡核苷酸与核酸扩增产物的有义链互补。将标记室加热至105 $^{\circ}$ C持续2分钟,然后维持在90 $^{\circ}$ C30秒,以诱导聚苯乙烯珠的沸腾和彻底的混合,并且使双链的DNA产物变性。加热后,允许标记室中的反应液冷却两分钟。对检测室排气,使得溶液从标记室流到检测室中并且流到检测条组件上。三条捕获线固定在侧流膜上;从装置的底部开始,它们为:不与任何测定的靶标互补的阴性对照寡核苷酸;与扩增产物互补的捕获探针;和与检测探针互补的阳性对照寡核苷酸。本发明成功地扩增并检测了靶核酸,没有与检测条的阴性对照线的可检测的交叉杂交。

[0204] 实施例6:用于检测菟丝子(五角菟丝子(*Cuscuta pentagona*))中的柑桔黄龙病菌亚洲种的扩增和检测靶核酸的方法

[0205] 其中一次性部件与可重复使用的坞站接口的本发明的实施方案如实施例3所述构造,并且用来在无需之前的核酸分离步骤的条件下检测粗长春花(*Catharanthus roseus*)组织提取物是否存在柑桔黄龙病菌亚洲种,其为柑桔黄龙病的致病因子。

[0206] 在一些情形中,将由反应酶和赋形剂组成的冻干的珠子添加到样品室中。在完成装置组装后,向样品室中加入40 $\mu$ L的反应混合物。取决于实验,扩增所需要的酶在该反应混合物中以液体形式存在,或以结合到流体层的样品室中的冻干的饼状物存在。在这两种情形中,样品由4 $\mu$ L通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中碾碎1cm长的菟丝子(五角菟丝子(*Cuscuta pentagona*))藤而制备的溶液组成。使用引物hyv1\_For和hyv1\_Rev来扩增139bp的核酸序

列,用于诊断植物致病性细菌柑桔黄龙病菌亚洲种的存在。进行专有扩增反应化学。预先制备扩增缓冲液(10X),其含有400mMTris-HCl(pH8.4),10mM硫酸铵,100mM氯化钾和0.25% Triton X-100。每40 $\mu$ L反应液包含:

[0207] 18.8 $\mu$ L水

[0208] 4.0 $\mu$ L10x扩增缓冲液

[0209] 4.0 $\mu$ LDMSO

[0210] 0.8 $\mu$ L氯化钾(2M)

[0211] 1.0 $\mu$ L氯化镁(100mM)

[0212] 1.0 $\mu$ L二硫苏糖醇(100mM)

[0213] 1.0 $\mu$ LdNTPs(10mM)

[0214] 4.0 $\mu$ L引物组hyv1\_For和hyv1\_Rev(每种8 $\mu$ M)

[0215] 1.0 $\mu$ LVentR(exo-)DNA聚合酶(2U/ $\mu$ L)\*

[0216] 0.4 $\mu$ LEt SSB,极端热稳定性单链结合蛋白(500 $\mu$ g/mL)\*

[0217] 4.0 $\mu$ L五角菟丝子(Cuscuta pentagona)提取物,其通过在500 $\mu$ L不含核酶的水中简单碾碎1cm长的藤而产生。

[0218] 尽管已经特别参考所述的实施方案详细描述了本发明,但是其他实施方案也能够获得相同的结果。本发明的变化和修改对于本领域技术人员是显而易见的,并且旨在涵盖所有这样的修改和等效形式。上文引用的所有专利和出版物的完整的公开内容通过引用结合于此。



## 序列表

	<110> 梅撒技术国际公司	
	<120> 用于核酸检测和鉴定的集成装置	
	<130> 33106-PCT1	
	<140> 61/477,357	
	<141> 2011-04-20	
	<150> 61/477,437	
	<151> 2011-04-20	
	<160> 4	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 正向引物 "hyv1_For"	
	<400> 1	
	ggccgttita acacaaaaga tgaatatcat agatggggta gtcaa	45
	<210> 2	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0001]	<220>	
	<223> 反向引物 "hyv1_Rev"	
	<400> 2	
	eggccatttt agataaatca atttgttcta gtttagatac atcaatttgt t	51
	<210> 3	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 捕获	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (21)..(31)	
	<223> n是a, c, g, 或t	
	<400> 3	
	tcgtttgagt agctagatcc nnnnnnnnnn nt	32
	<210> 4	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 检测	
	<400> 4	
	aattgatgga tgacgtgata gttfacgacc aacatctt	38

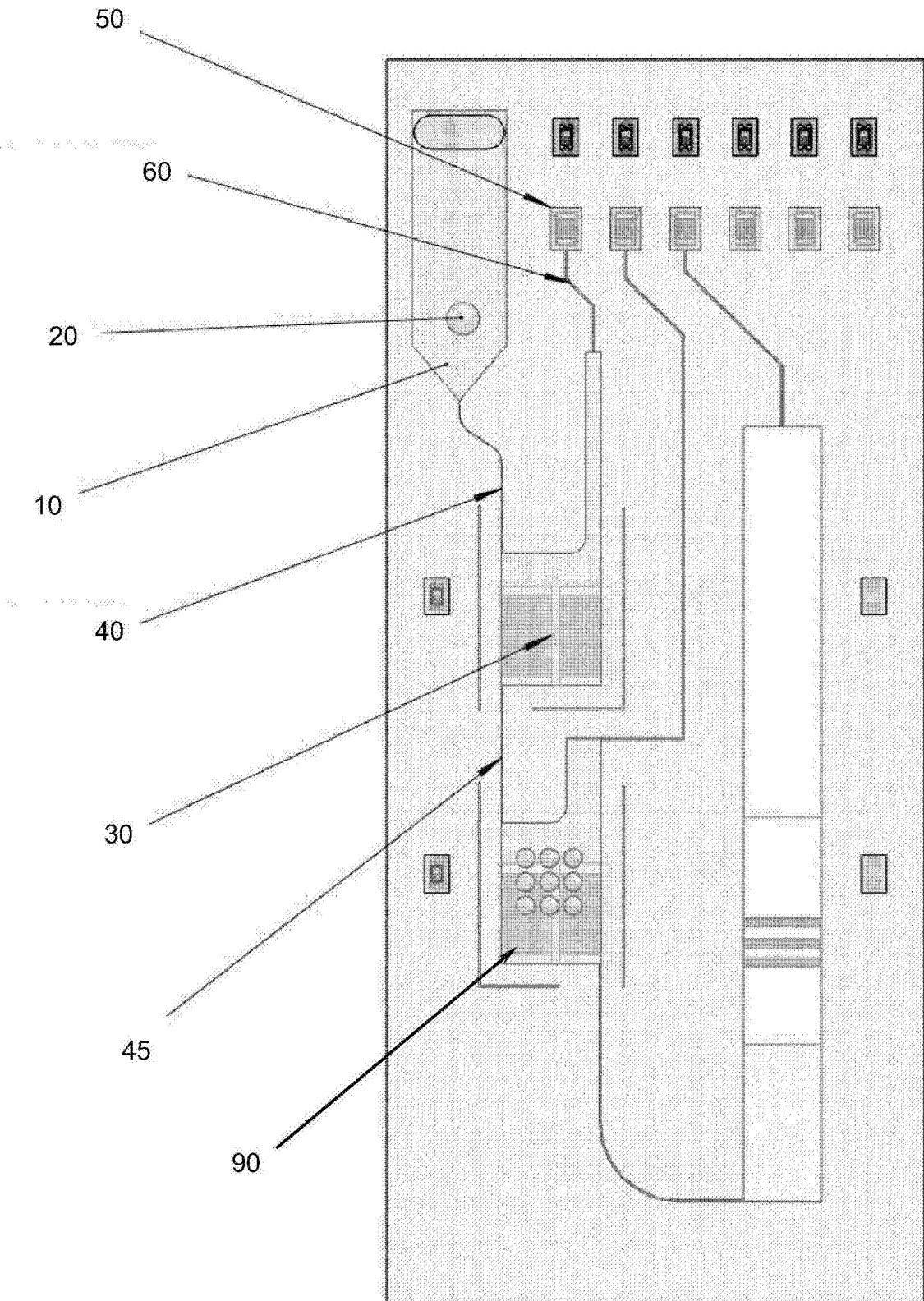


图1

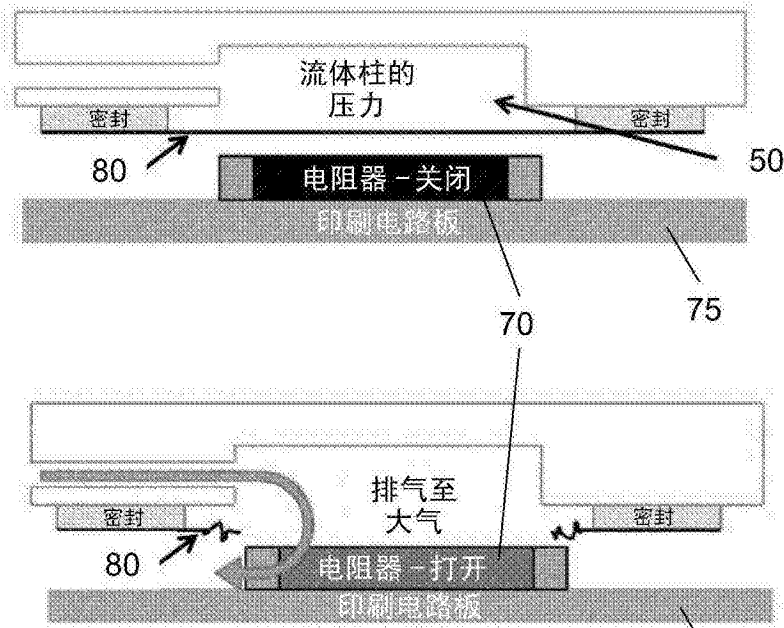


图 2A

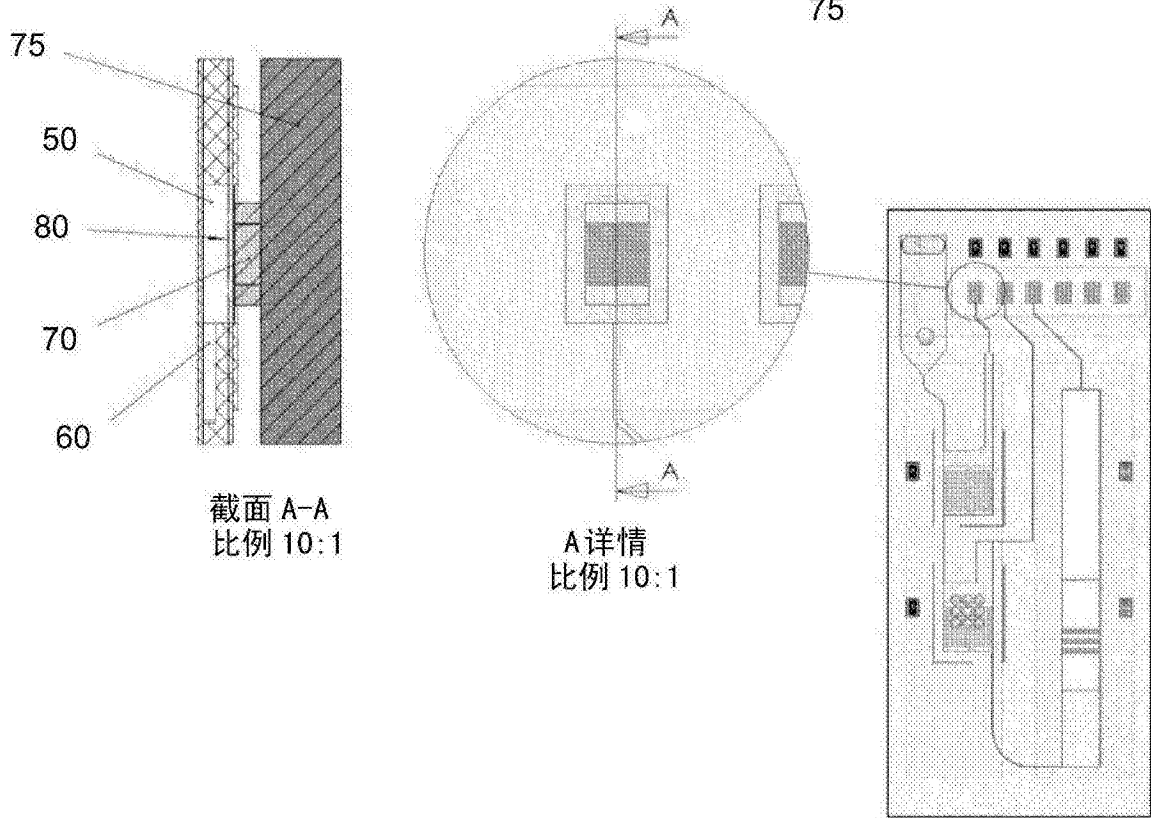


图 2B

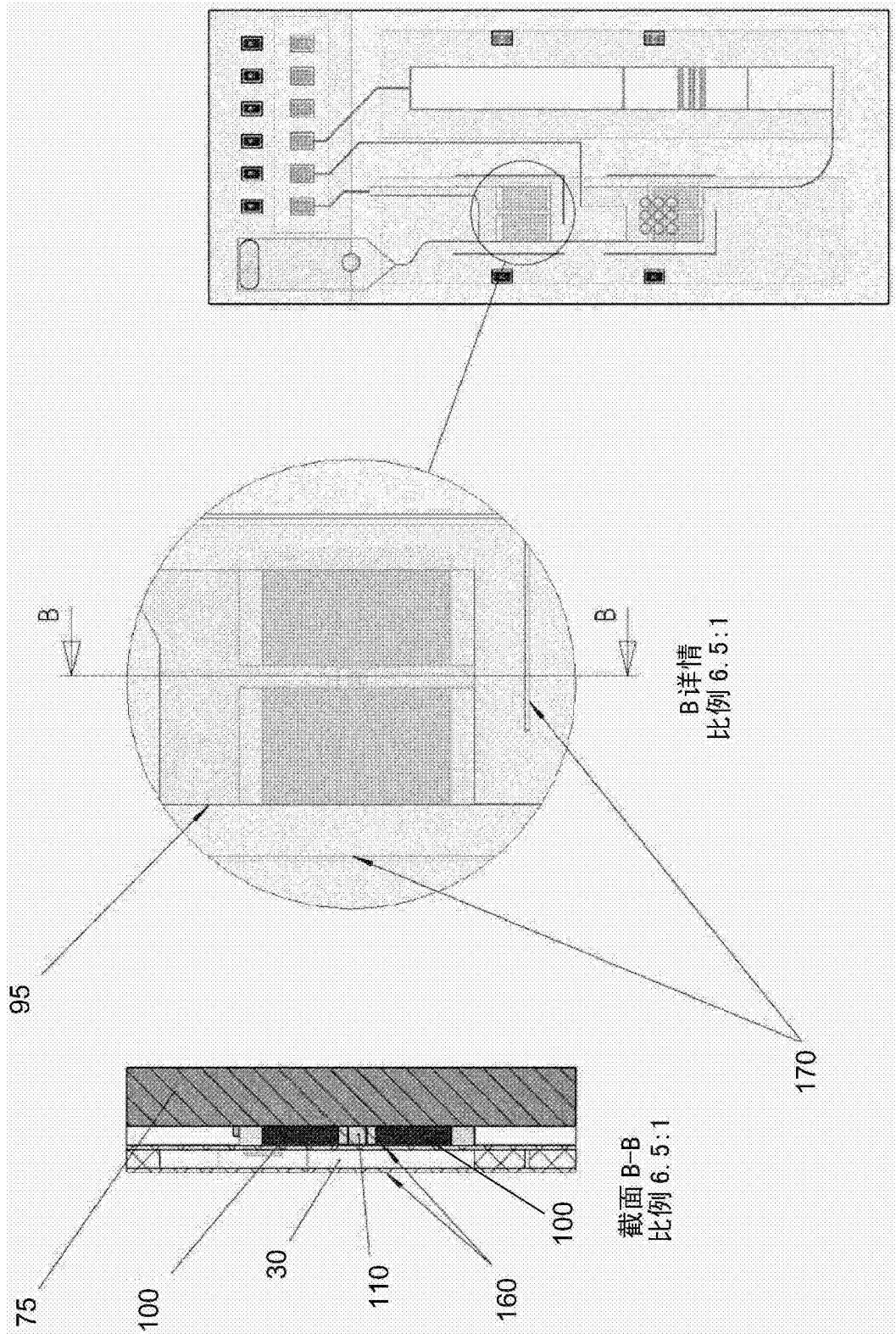


图3

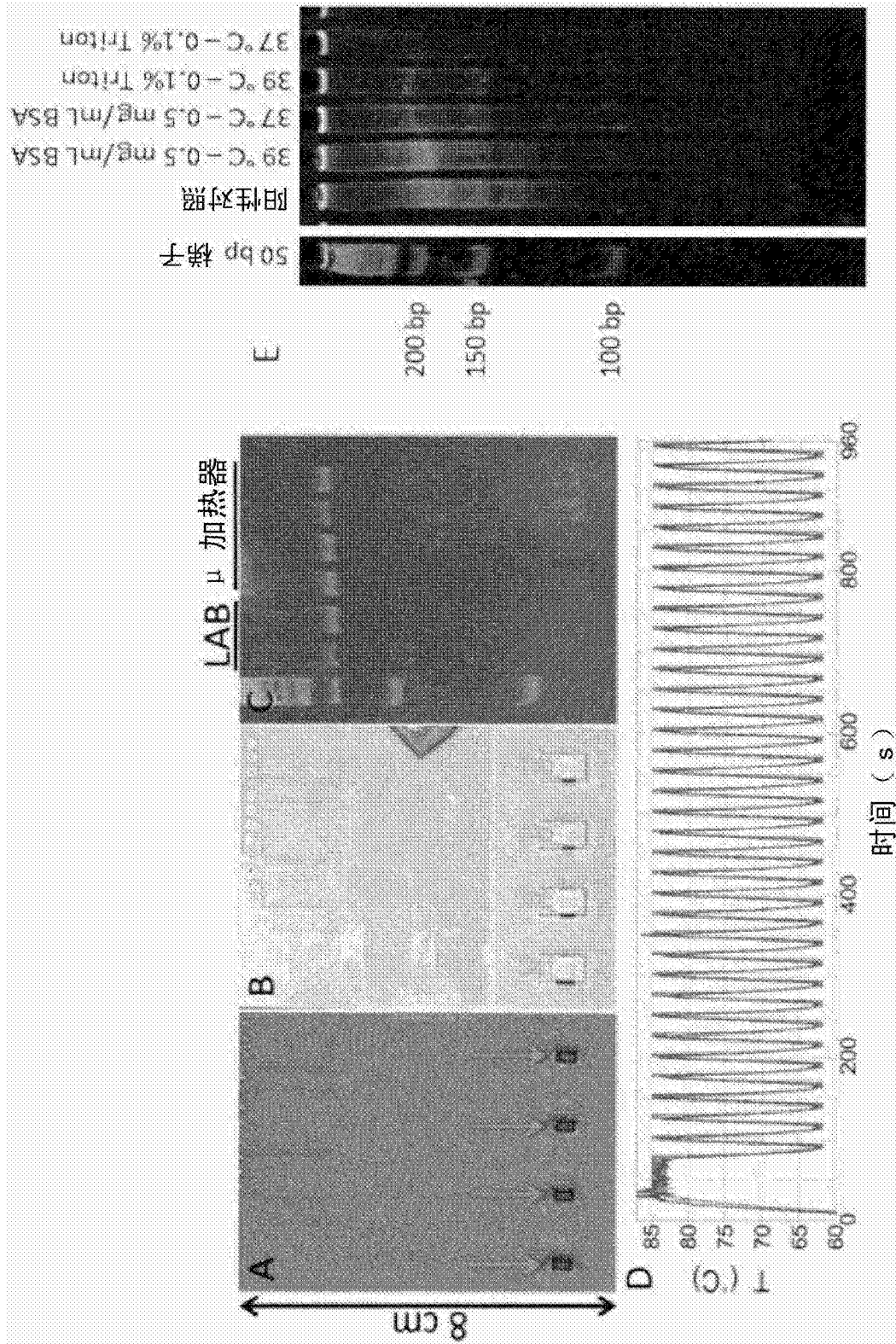


图4

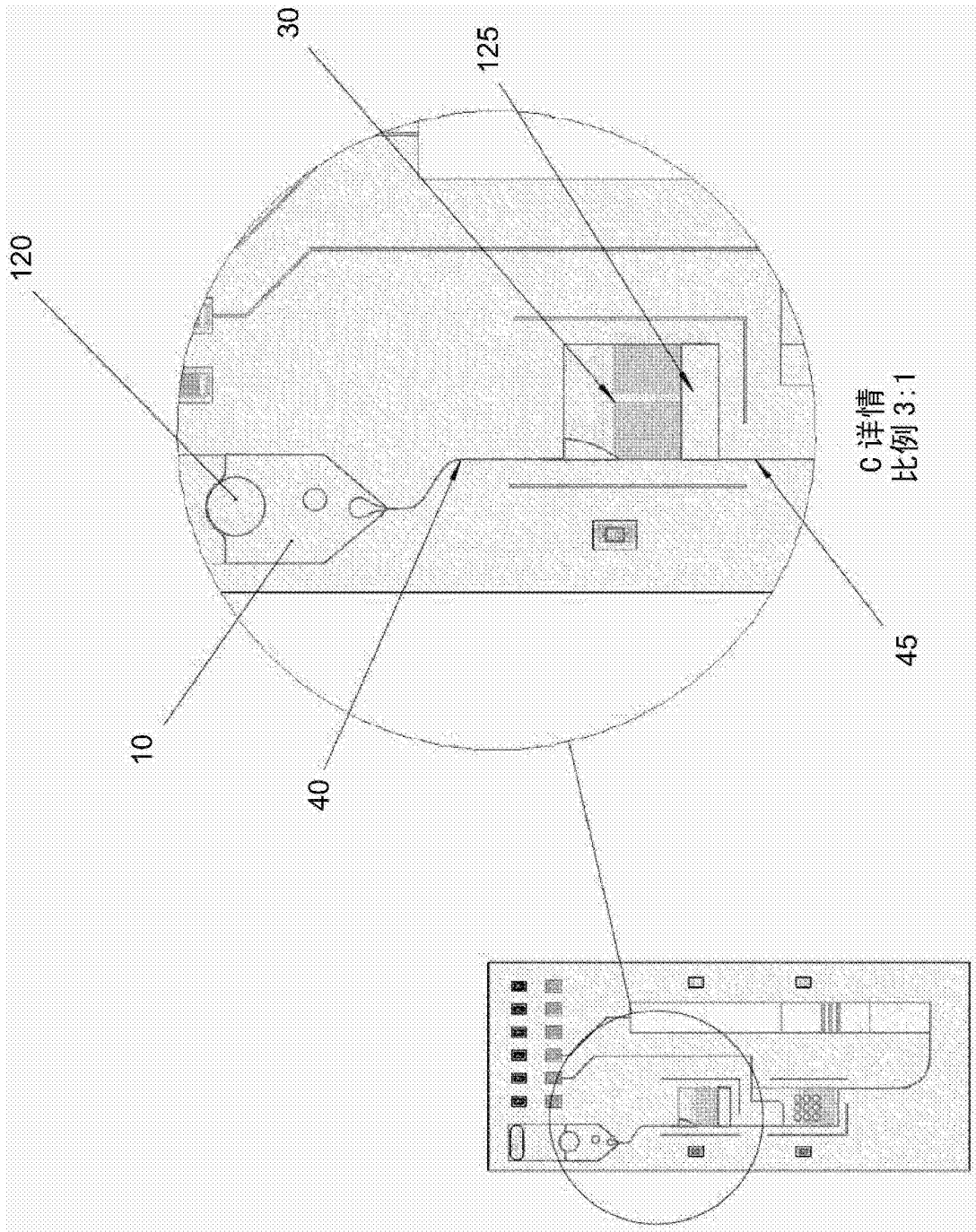


图5

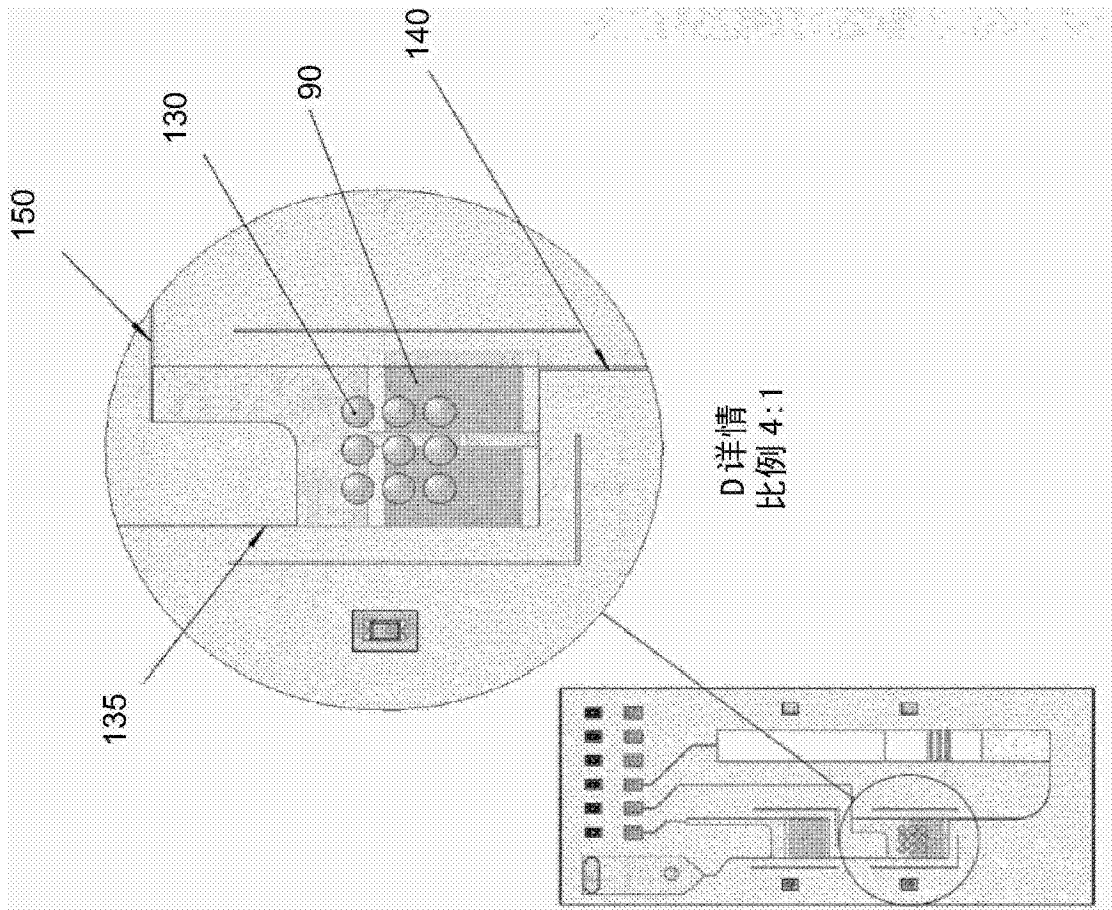


图6A

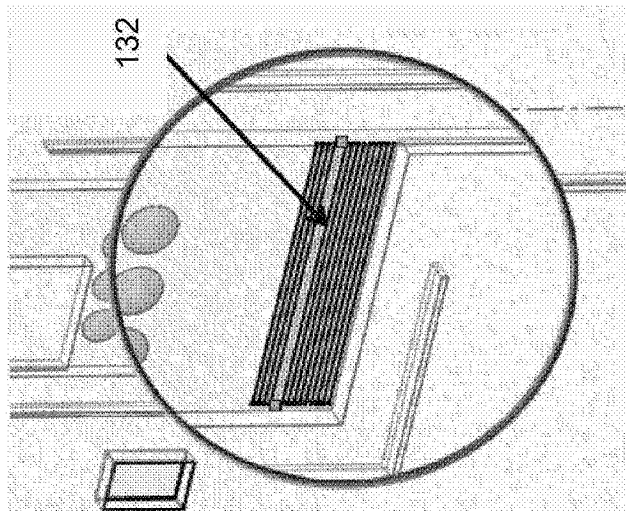


图6B

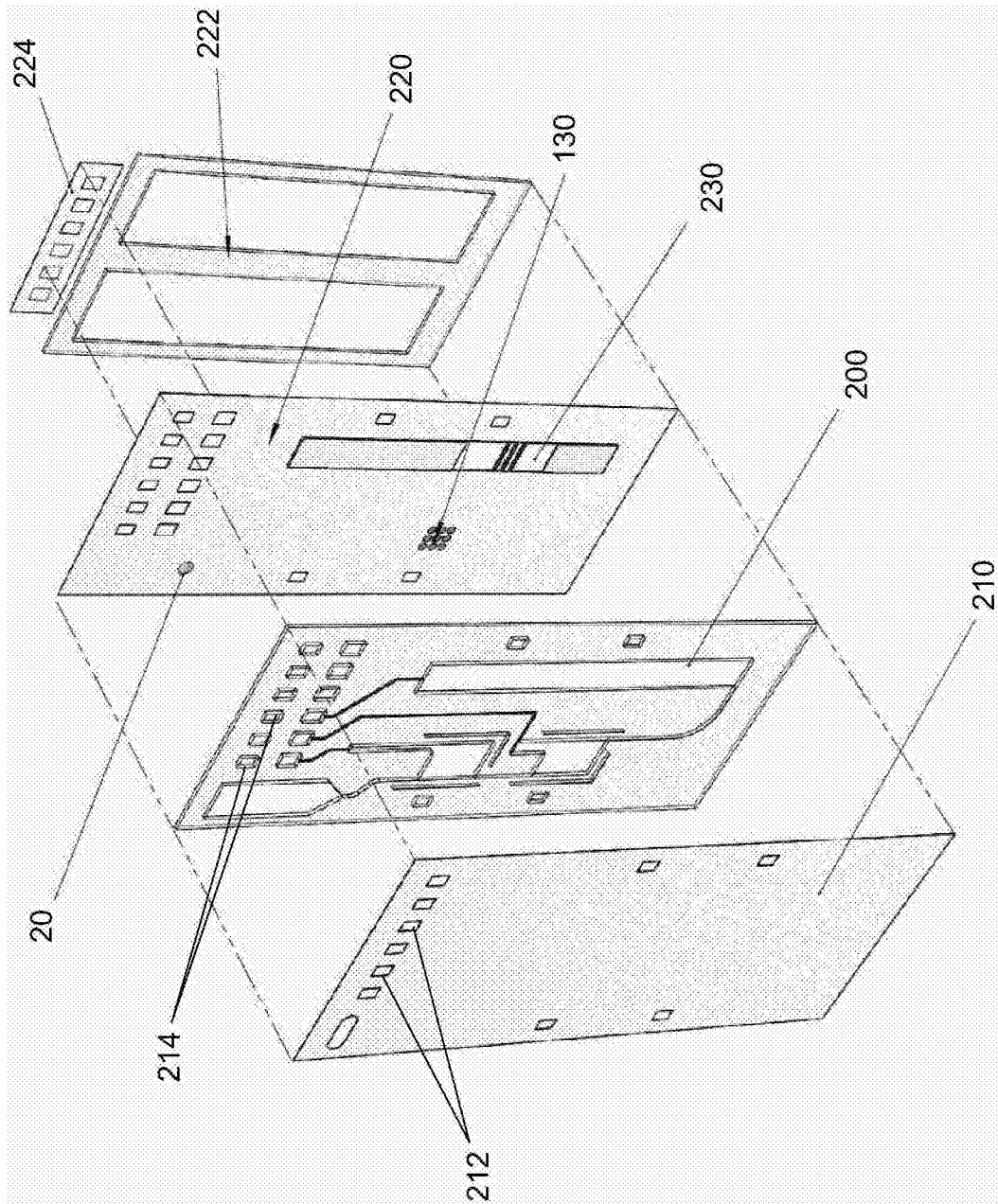


图7



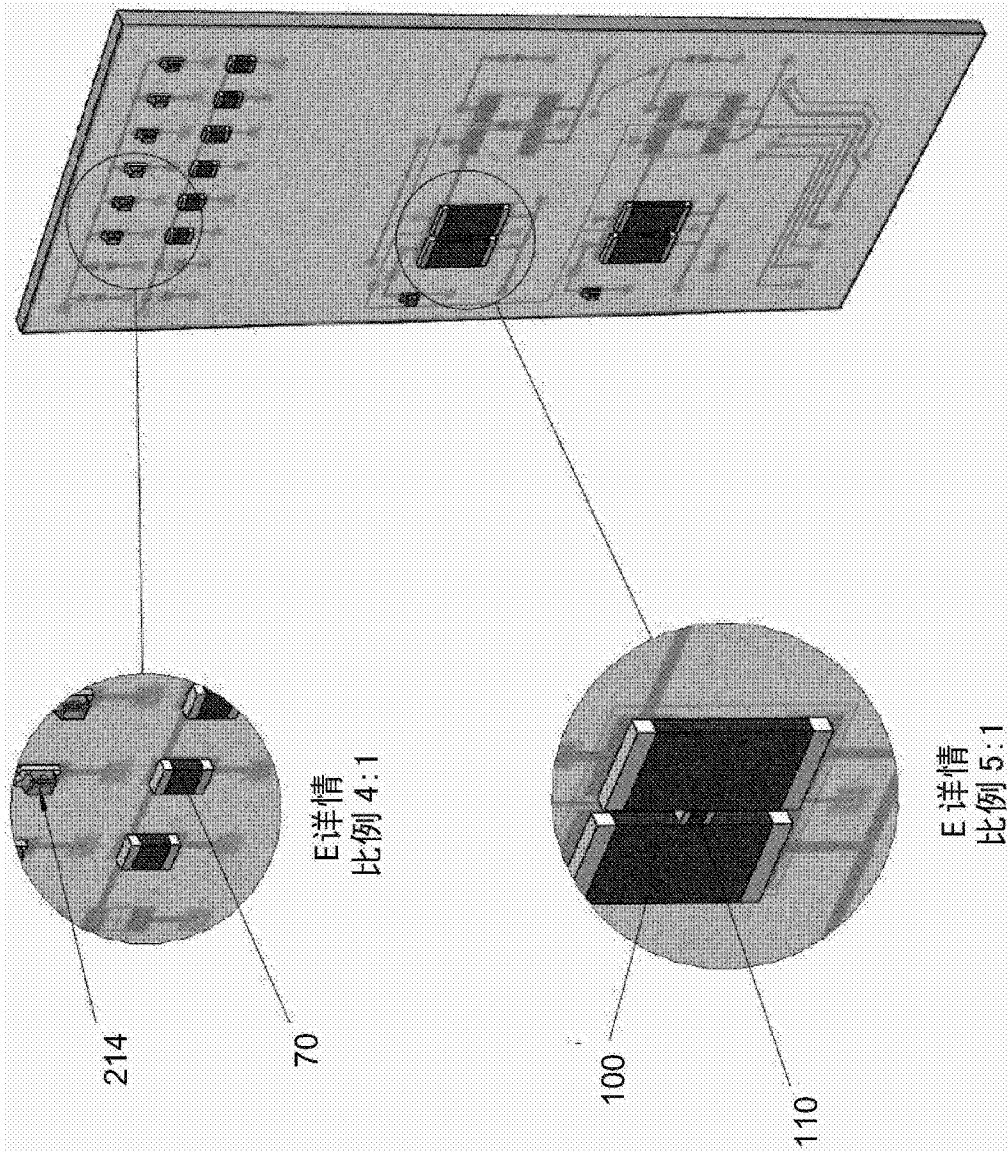


图8

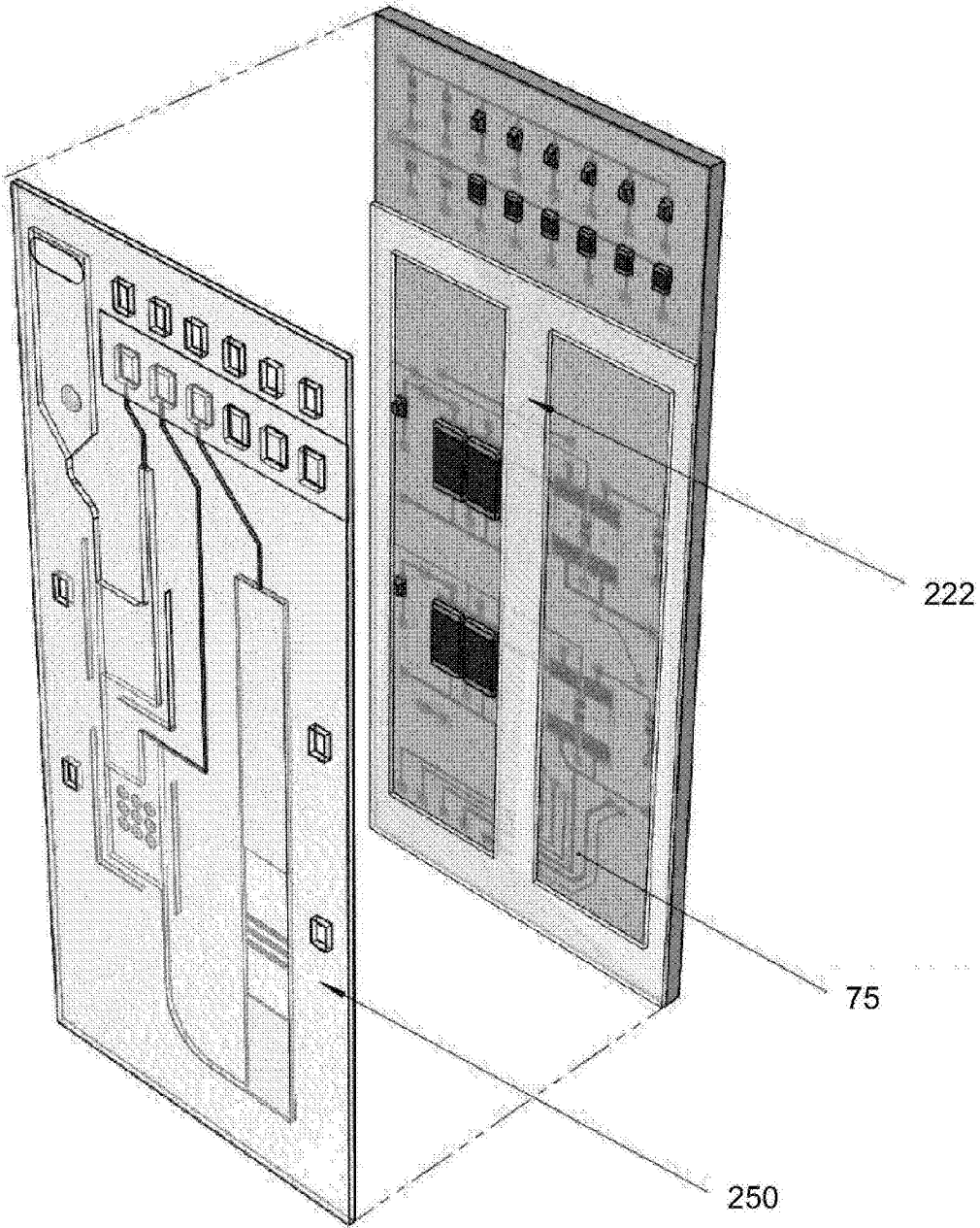


图9

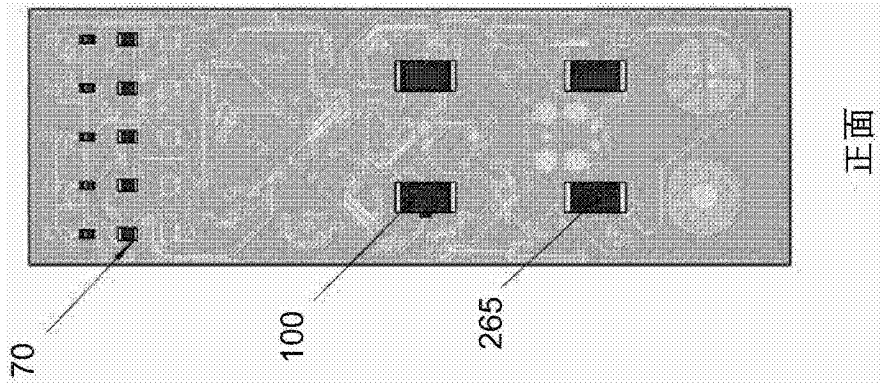


图11A

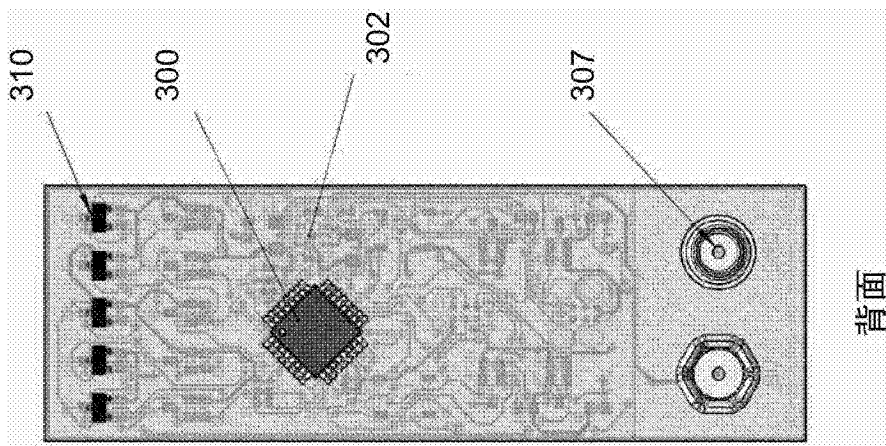


图11B

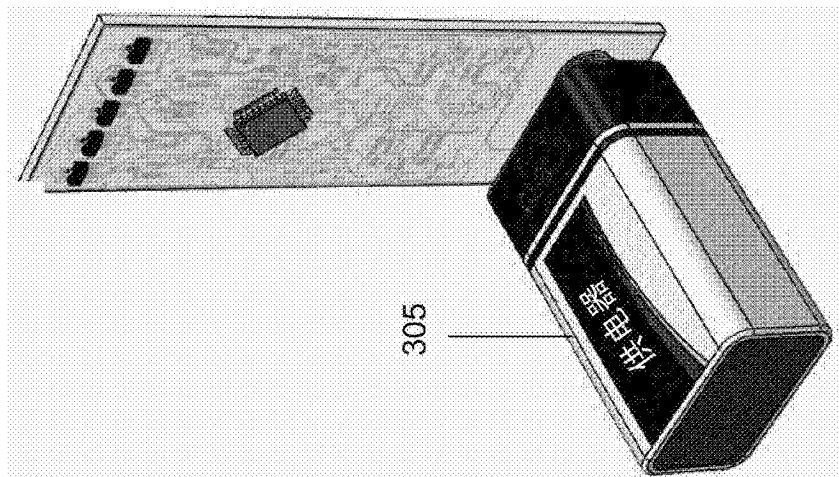


图11C

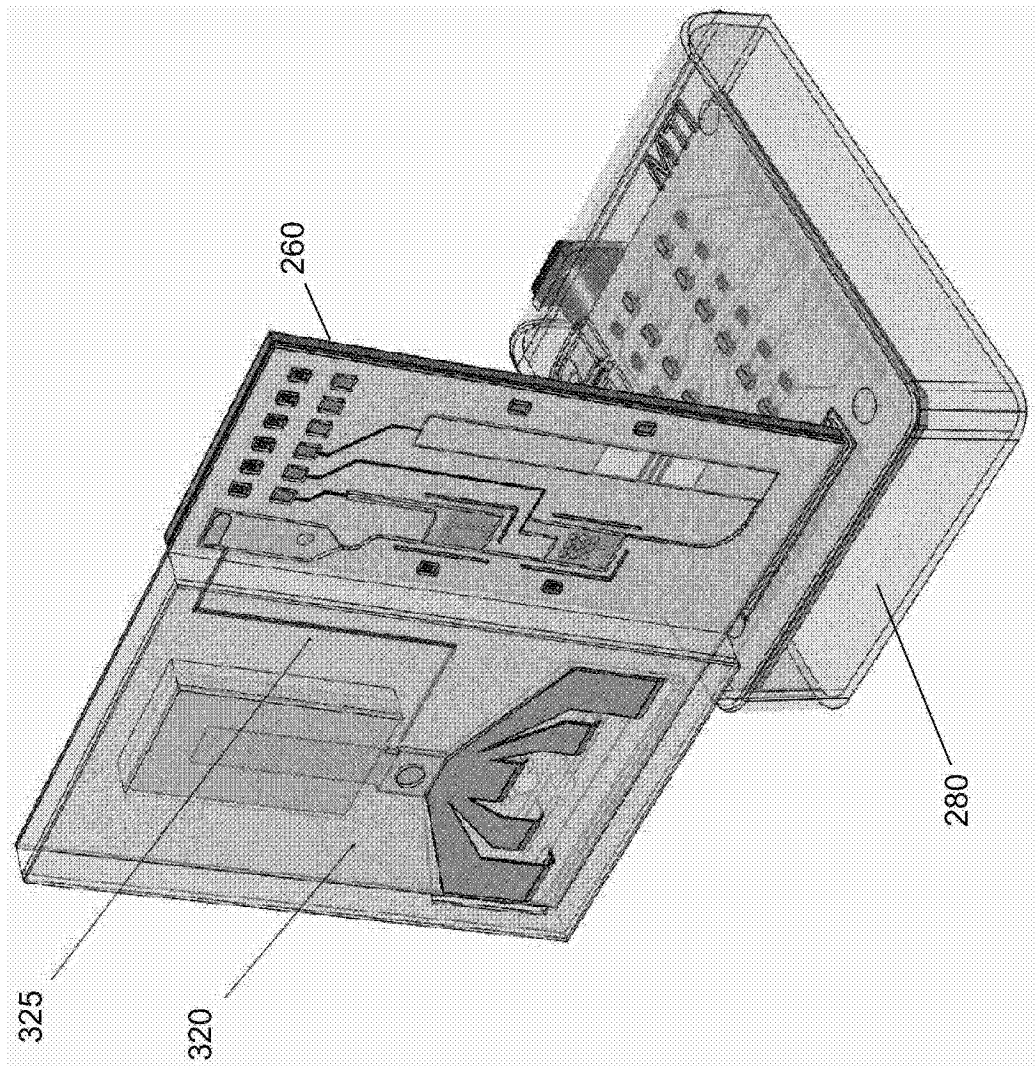


图12

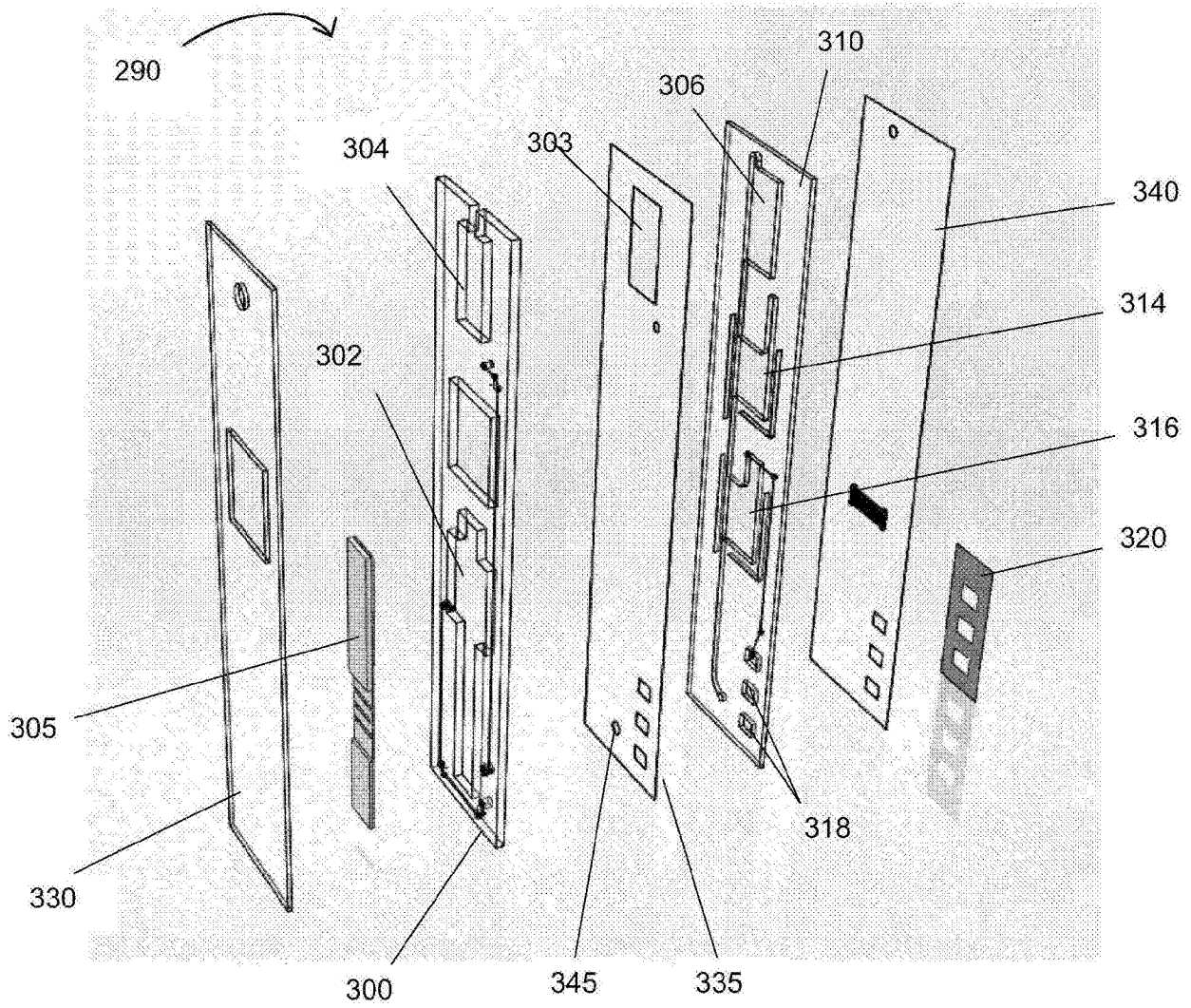


图13

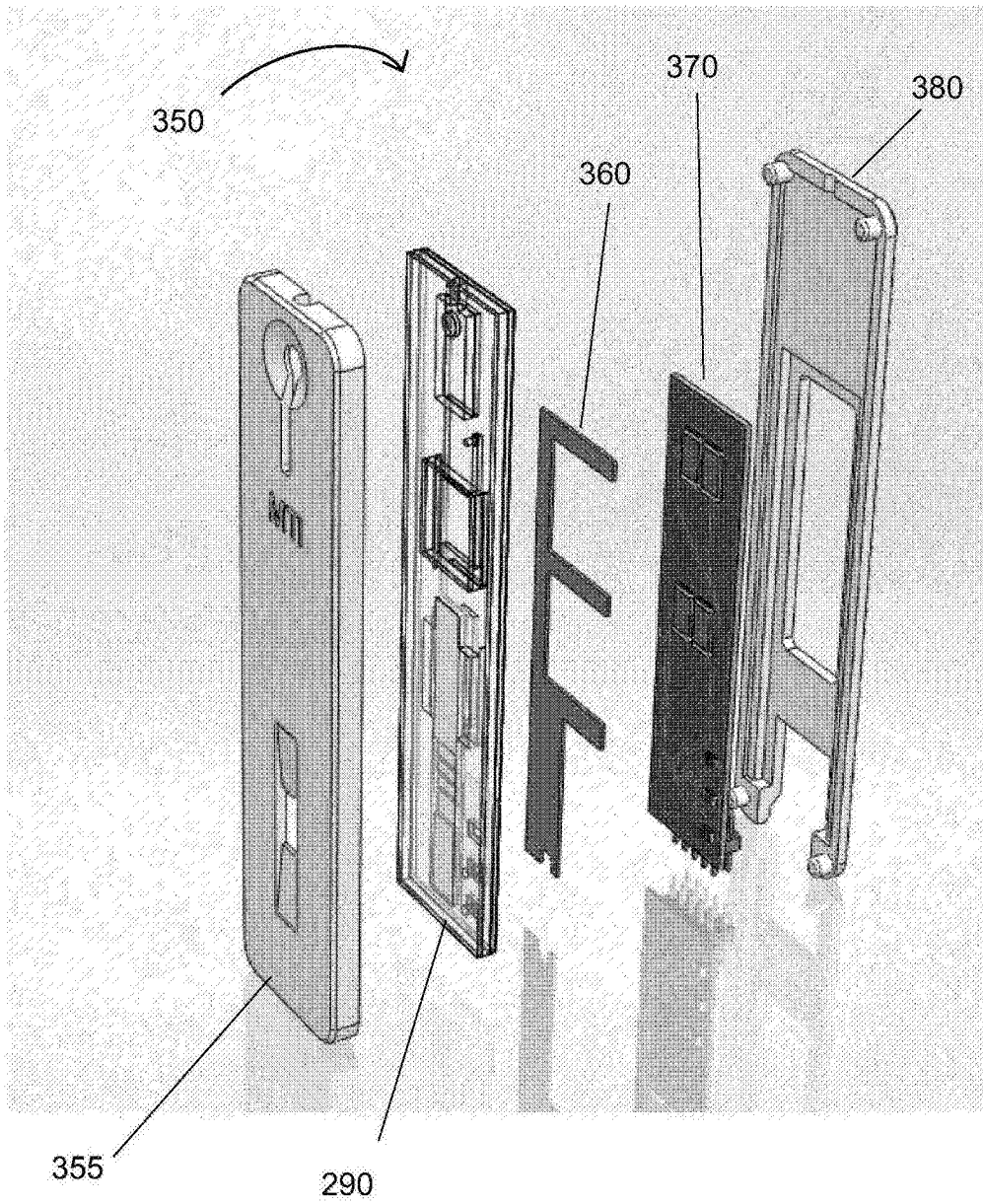


图14



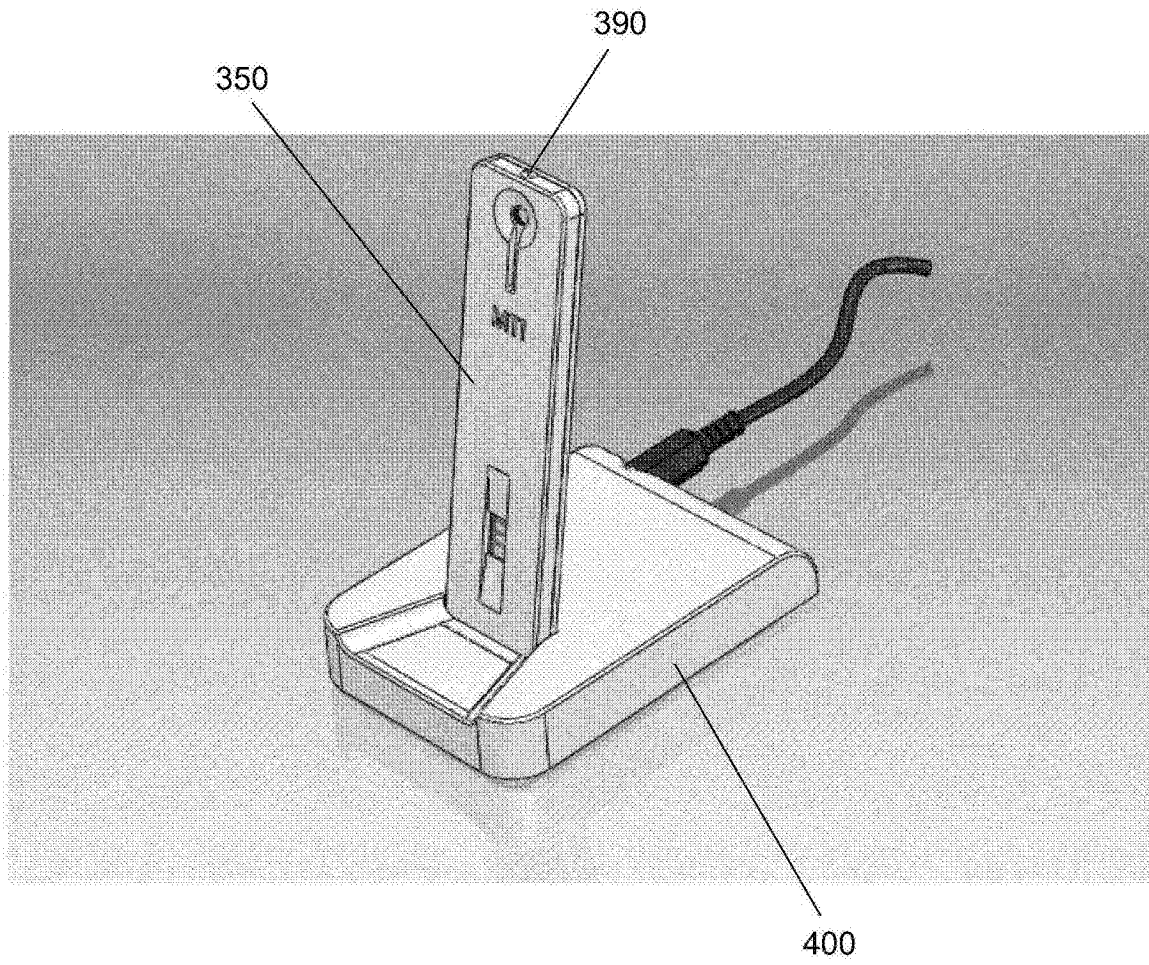


图15

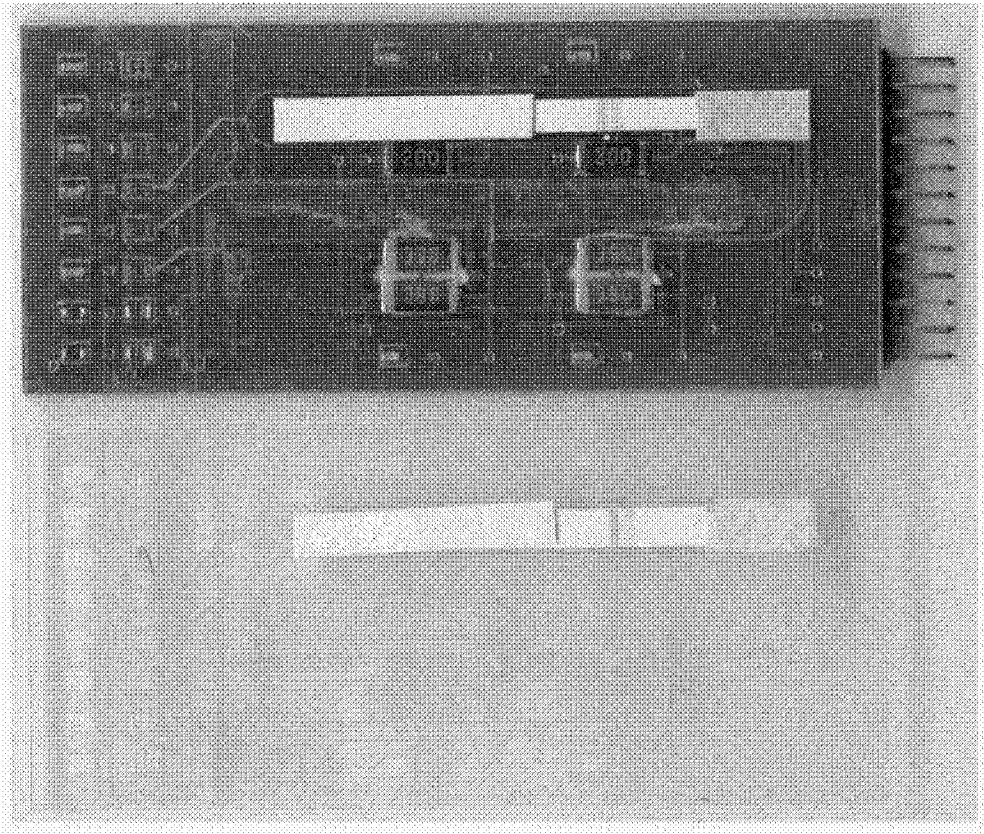


图16A



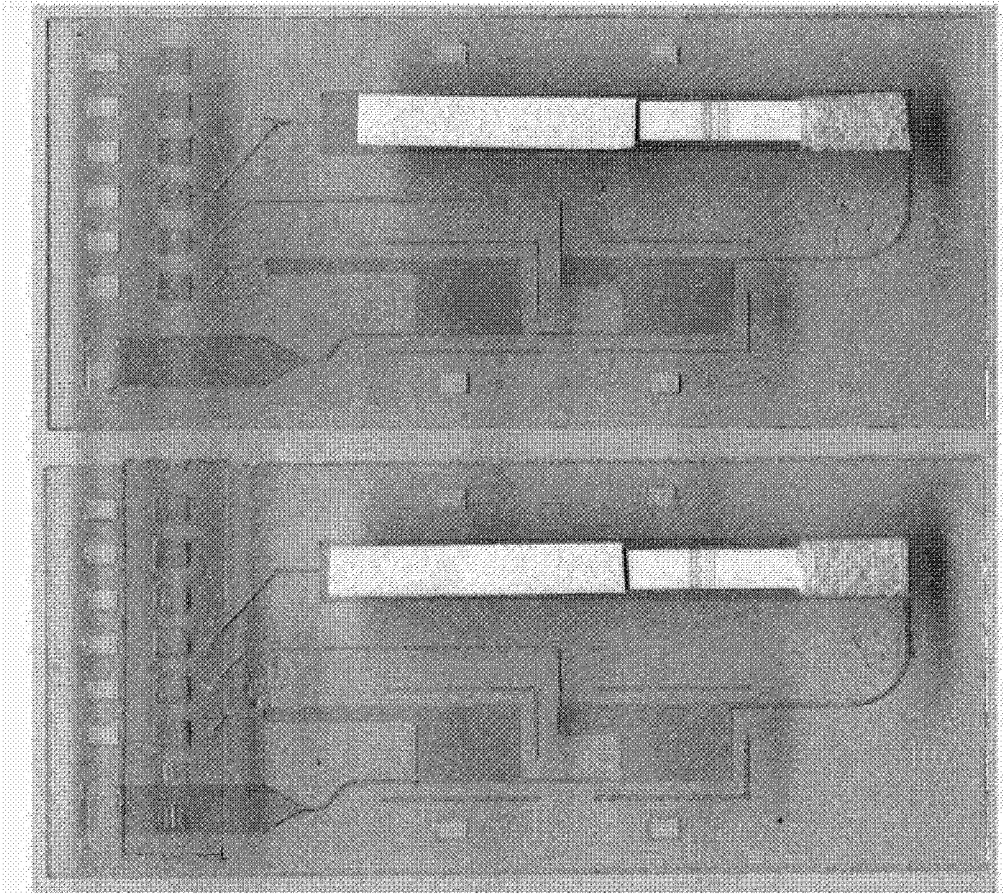


图16B

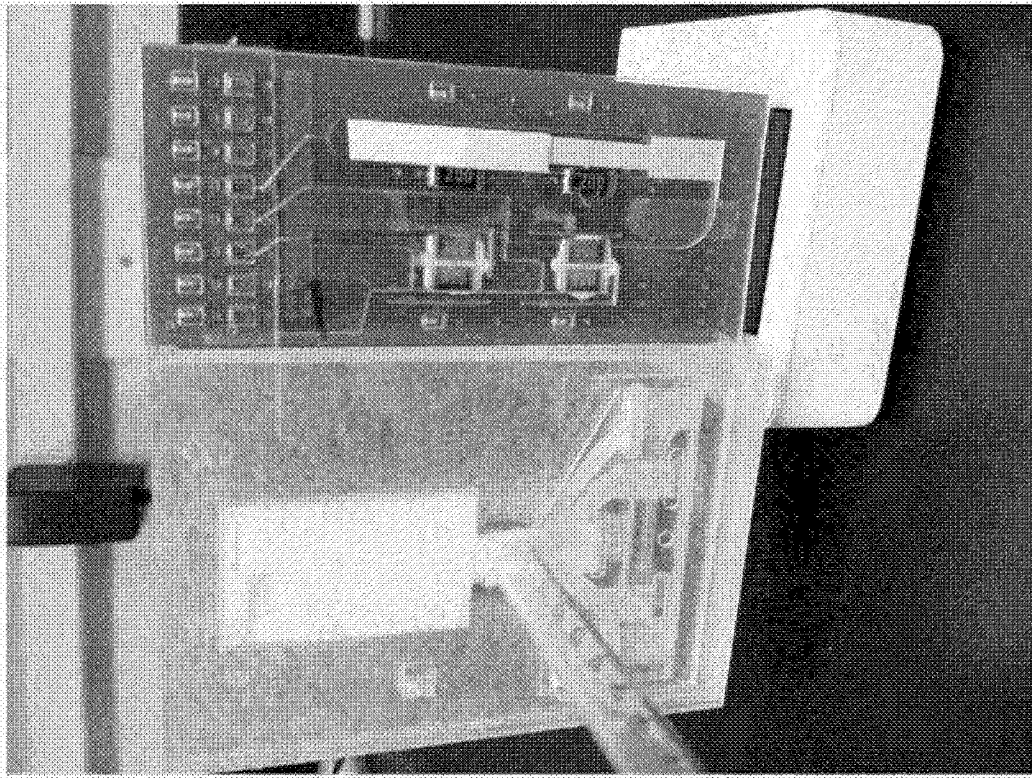


图 17B

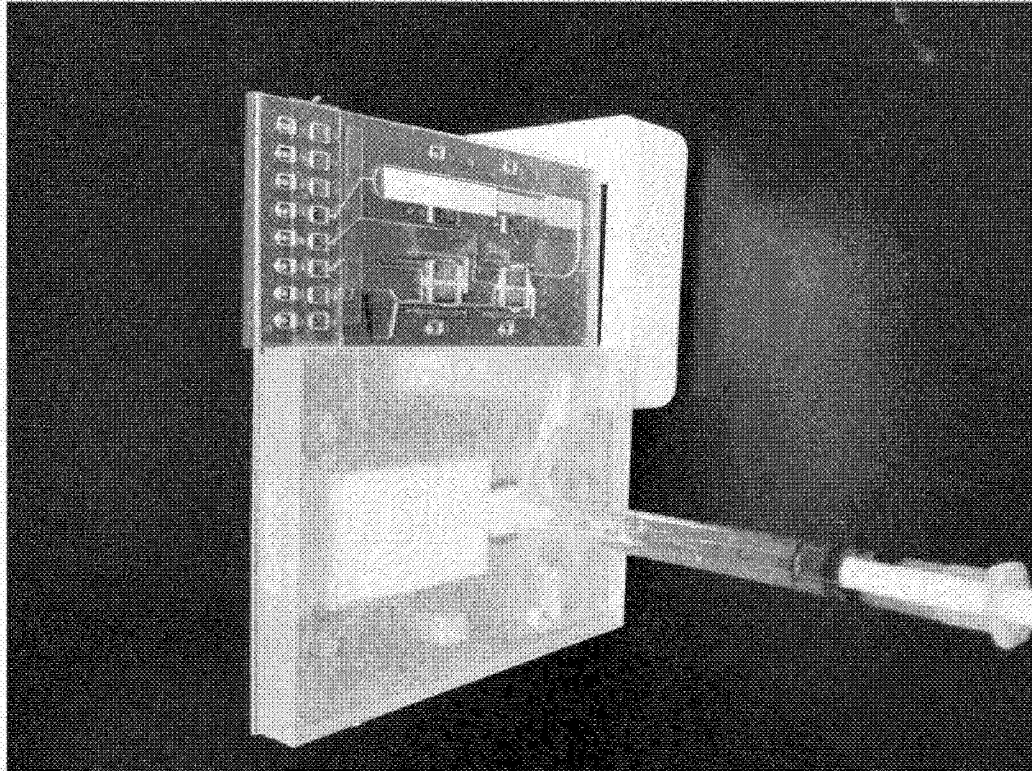


图 17A